

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Rafael Marques**

**Caracterização não invasiva de fase estacionária monolítica para uso em  
eletrocromatografia capilar e nano-cromatografia a líquido**

**Juiz de Fora**  
**2017**

**Rafael Marques**

**Caracterização não invasiva de fase estacionária monolítica para uso em  
eletrocromatografia capilar e nano-cromatografia a líquido**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Co-orientador: Dr. Claudimir Lucio do Lago

**Juiz de Fora**

**2017**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Marques, Rafael.

Caracterização não invasiva de fase estacionária monolítica para uso em eletrocromatografia capilar e nano-cromatografia a líquido / Rafael Marques. -- 2017.

95 p. : il.

Orientador: Marcone Augusto Leal de Oliveira

Coorientador: Claudimir Lucio do Lago

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2017.

1. Fase Estacionária Monolítica. 2. Cromatografia a Líquido. 3. Eletrocromatografia Capilar. 4. Detector Condutométrico Sem Contato. 5. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear. I. de Oliveira, Marcone Augusto Leal, orient. II. do Lago, Claudimir Lucio, coorient. III. Título.

*Dedico este trabalho aos meus falecidos avós, Maria Rita e José Marques, por terem sido fundamentais em minha formação pessoal e infelizmente não estão mais presentes para acompanhar minhas conquistas; à minha mãe Simone, maior amiga e companheira, que deu-me todas as condições para que eu pudesse chegar até aqui; ao meu irmão Rodrigo, que preenche-me com boas recordações da infância; e à Nina, minha irmã canina, que mesmo sem poder entender meu compromisso com esta tese, sempre esteve ao meu lado pacientemente observando-me enquanto escrevia e aguardando-me, cheia de amor, retornar do laboratório.*

## AGRADECIMENTOS

Ao *professor Marcone*, que acreditou em meu potencial e, sempre de bom humor, apoiou e incentivou o meu trabalho, proporcionando um grande aprendizado e agradável convivência.

Ao *professor Claudimir*, da Universidade de São Paulo, por despertar a ideia original deste projeto e receber-me de prontidão no Laboratório de Automação e Instrumentação Analítica.

Ao *Dr. Kelliton Francisco*, também da Universidade de São Paulo, por ter sido sempre solícito e generoso, esclarecendo questões sobre o funcionamento do detector condutométrico e reparando-o sempre que necessário.

Ao *Dr. Gustavo Senra*, pela contribuição nas análises de RMN e orientação na interpretação dos espectros.

Aos meus colegas do *Grupo de Química Analítica e Quimiometria*, que me acolheram de braços abertos, compartilharam prazerosos cafezinhos e ajudaram-me sempre que foi preciso.

Aos membros das bancas de qualificação e de defesa, *Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli, Dr. Fernando Antonio Simas Vaz, Dra. Maria Auxiliadora Costa Matos, Dr. Gustavo Fernandes Souza Andrade, Dr. Giovanni Wilson Amarante e Dr. Júlio César José da Silva*. Obrigado por aceitarem o convite de participação e pelas críticas e sugestões pertinentes.

À *Universidade Federal de Juiz de Fora* e ao *Departamento de Química* pelo empenho em manter uma pós-graduação de alto nível e por me conceder a oportunidade de crescimento e contribuição acadêmica.

À CAPES, por me conceder a bolsa de doutorado, e finalmente aos órgãos financiadores dos projetos envolvidos, FAPEMIG e CNPq.

## RESUMO

Esta tese de doutorado aborda o preparo, a caracterização e a utilização de fases estacionárias monolíticas para uso em colunas de separação cromatográfica em escala capilar. As fases estacionárias foram preparadas pela polimerização do monômero 3-(metacriloxipropil)-trimetoxisilano em duas etapas envolvendo primeiramente um processo sol-gel e depois um processo de adição radicalar fotoiniciado. A fotopolimerização foi feita *in situ* em capilares de sílica fundida transparentes à radiação UV com 100 µm de diâmetro interno. As colunas produzidas foram aplicadas qualitativamente com sucesso na separação de cinco hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e três hormônios esteroides, tanto por cromatografia a líquido capilar quanto por eletrocromatografia capilar em um equipamento de eletroforese capilar. A eletrocromatografia foi usada para analisar quantitativamente uma amostra de emulsão transdérmica contendo estriol e 17-β-estradiol. Como tentativa de melhorar a separação entre alguns analitos, foi feita a modificação do polímero adicionando o monômero benzil metacrilato, porém sem sucesso. As colunas foram caracterizadas com relação à sua homogeneidade física usando um microscópio óptico e um detector condutométrico sem contato capacitivamente acoplado. O detector foi usado como um *scanner* não invasivo deslocando-se longitudinalmente ao longo da coluna externamente ao capilar. A caracterização química do polímero foi feita através da espectroscopia de ressonância magnética nuclear no estado sólido dos núcleos de <sup>13</sup>C e de <sup>29</sup>Si. Foi possível propor uma estrutura para o arranjo da cadeia carbônica e o grau de substituição do grupo silil indicando a reticulação das cadeias poliméricas através da formação de dímeros e trímeros condensação de grupos alcoxissilanos.

Palavras-chave: Fase estacionária monolítica. Eletrocromatografia capilar. Cromatografia a líquido. Detector condutométrico sem contato capacitivamente acoplado. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

## ABSTRACT

This doctoral thesis addresses the preparation, characterization and use of monolithic stationary phases for chromatographic separation columns in capillary scale. The stationary phases were prepared by polymerizing the 3-(methacryloxypropyl) trimethoxysilane monomer in two steps involving a sol-gel process followed by a photoinitiated radical addition. The photopolymerization was carried out in UV transparent coating fused silica capillaries with 100  $\mu\text{m}$  of internal diameter. The columns were applied in the qualitative separation of five polycyclic aromatic hydrocarbons and three steroid hormones, both by capillary liquid chromatography and capillary electrochromatography in a capillary electrophoresis equipment. Electrochromatography was used to quantitative analysis of a transdermal emulsion sample containing estriol and 17- $\beta$ -estradiol. In an attempt to improve the separation between some analytes, the polymer was modified by adding the benzyl methacrylate monomer, but without success. The columns were characterized with respect to their physical homogeneity using an optical microscope and a capacitively coupled contactless conductivity detector. The detector was used as a non-invasive scanner moving longitudinally along the column externally to the capillary. The chemical characterization of the polymer was done by the solid state  $^{13}\text{C}$  and  $^{29}\text{Si}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. It was possible to propose a carbon chain structure and the substitution degree of the silyl group indicating the cross-linking of the polymer chains through the formation of dimers and trimers by condensation of the alkoxysilane groups.

Keywords: Monolithic stationary phase. Capillary electrochromatography. Liquid chromatography. Capacitive coupled contactless conductivity detector. Nuclear magnetic resonance spectroscopy.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 – Ilustração exemplificando uma coluna monolítica no interior de um tubo capilar.....   | 22 |
| Figura 2 – Estrutura do monômero 3-(metacriloxipropil)-trimetoxisilano (MPTMS) .....   | 25 |
| Figura 3 – Etapas de hidrólise e condensação do 3-(metacriloxipropil)-trimetoxisilano levando à formação de um dímero .....                                  | 25 |
| Figura 4 – Esquema mostrando a ancoragem de um trímero formado a partir do 3-(metacriloxipropil)-trimetoxisilano à parede interna do capilar de sílica ..... | 26 |
| Figura 5 – Estrutura do monômero benzil metacrilato.....   | 27 |
| Figura 6 – Formação de radicais a partir do 2,2'-azobis(2-metilpropionitrila) ...  | 27 |
| Figura 7 – Formação de radicais a partir da fotólise do óxido de fenilbis(2,4,6-trimetilbenzoil)fosfina.....   | 28 |
| Figura 8 – Fotografia de um detector condutométrico posicionado ao longo de um capilar e esquema ilustrando uma cela oscilométrica .....                     | 30 |
| Figura 9 – Dispositivo de pressurização para controle da inserção de fluídos no capilar.....   | 33 |
| Figura 10 – Fluxograma do processo de produção das colunas monolíticas...  | 35 |
| Figura 11 – Fotografia mostrando seringas e conexões utilizadas no preparo das colunas monolíticas .....   | 36 |
| Figura 12 – Fotografia mostrando os capilares contendo as colunas monolíticas preenchidas com solvente para serem armazenadas .....                          | 38 |
| Figura 13 – Fotografia do esquema experimental mostrando o posicionamento do detector condutométrico ao longo da coluna monolítica .....                     | 39 |
| Figura 14 – Esquema geral de procedimento para as análises.....  | 41 |
| Figura 15 – Fotografias do procedimento de limpeza dos polímeros para análise de NMR .....   | 42 |



|  |    |
|--|----|
| Figura 16 – Fotografia de três colunas monolíticas com diferentes homogeneidades físicas.....  | 44 |
| Figura 17 – Fotografia mostrando o posicionamento do C <sup>4</sup> D no capilar TSP para monitorar o preenchimento .....                    | 47 |
| Figura 18 – Gráfico de condutividade em função do tempo indicando o preenchimento do capilar .....   | 48 |
| Figura 19 – Imagem de microscópio óptico mostrando um capilar TSP vazio e outro com coluna monolítica.....                                   | 49 |
| Figura 20 – Imagem de microscópio óptico de colunas monolíticas mostrando a diferença quando a solução fotopolimerizável é centrifugada..... | 51 |
| Figura 21 – Imagem de microscópio óptico de uma coluna monolítica com variação da densidade de material polimérico .....                     | 52 |
| Figura 22 - Gráfico de condutividade em função do tempo mostrando variações da densidade de material polimérico ao longo de uma coluna.....  | 53 |
| Figura 23 – Curvas de massa de fase móvel em função do tempo de corrida para os diferentes níveis de pressão.....                            | 56 |
| Figura 24 – Curva de vazão de fase móvel em função da pressão aplicada ...   | 58 |
| Figura 25 – Cromatogramas das primeiras 9 corridas de uma coluna monolítica nova .....   | 59 |
| Figura 26 – Fotografia mostrando os polímeros preparados em seringas e os resíduos após limpeza com metanol .....                            | 60 |
| Figura 27 – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos utilizados como mistura teste .....  | 61 |
| Figura 28 – Cromatogramas das análises de HPAs no planejamento fatorial 3 <sup>2</sup> para uma coluna de 8,0 cm.....                        | 63 |
| Figura 29 – Esquema mostrando um capilar com 27,0 cm de coluna monolítica no equipamento de CE.....  | 65 |
| Figura 30 – Cromatogramas das análises de HPAs no planejamento fatorial 3 <sup>2</sup> para uma coluna de 27,0 cm.....                       | 66 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 31 – Cromatograma e eletrocromatograma da análise de HPAs para uma coluna de 8,0 cm .....  | 67 |
| Figura 32 – Cromatograma da análise de HPAs com uma coluna monolítica modificada com benzil metacrilato .....   | 70 |
| Figura 33 – Estrutura do estriol, 17- $\beta$ -estradiol e progesterona e seus respectivos valores de pK <sub>a</sub> .....                           | 72 |
| Figura 34 – Cromatogramas das análises de esteroides no planejamento fatorial 3 <sup>2</sup> para uma coluna de 8,0 cm.....                           | 73 |
| Figura 35 – Eletrocromatograma de uma análise de esteroides por CEC em uma coluna monolítica de 8,0 cm.....   | 74 |
| Figura 36 – Resultados da curva de adição de padrão .....   | 76 |
| Figura 37 – Espectros de NMR no estado sólido do <sup>13</sup> C no polímero da coluna monolítica .....   | 79 |
| Figura 38 – Possível arranjo da cadeia carbônica na estrutura do polímero da coluna monolítica baseada no MPTMS.....                                  | 80 |
| Figura 39 – Processo de adição radicalar do fotoiniciador ao monômero metacrilato.....  | 81 |
| Figura 40 – Esquema mostrando a representação universal dos deslocamentos químicos de <sup>29</sup> Si, símbolos e ordens das espécies de silil ..... | 82 |
| Figura 41 - Espectros de NMR no estado sólido do <sup>29</sup> Si no polímero da coluna monolítica.....   | 83 |
| Figura 42 – Estrutura polimérica com diferentes possibilidades de reticulação por ligações siloxanas entre unidades do MPTMS.....                     | 85 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 – Classificação de técnicas de cromatografia a líquido .....  | 16 |
| Tabela 2 – Composição das soluções polimerizáveis .....  | 34 |
| Tabela 3 – Valores médios de vazão de fase móvel e desvio padrão para diferentes níveis de pressão.....  | 56 |
| Tabela 4 – Tempo de retenção da tioureia para diferentes níveis de pressão e desvio padrão relativo da vazão de fase móvel.....  | 57 |
| Tabela 5 – Planejamento fatorial $3^2$ variando em três níveis a porcentagem de ACN e a pressão de bombeamento da fase móvel .....                                       | 62 |
| Tabela 6 – Valores de resolução para os pares de picos dos HPAs em coluna de 8,0 cm .....  | 64 |
| Tabela 7 – Número de pratos em CEC e CLC na análise de HPAs.....   | 68 |
| Tabela 8 – Valores de resolução para os pares de picos dos HPAs em coluna modificada e não modificada.....   | 69 |
| Tabela 9 – Valores de número de pratos e área de pico em coluna modificada e não modificada .....  | 71 |
| Tabela 10 – Deslocamentos químicos obtidos do espectro de NMR no estado sólido do $^{13}\text{C}$ no polímero da coluna monolítica e suas respectivas atribuições .....  | 78 |
| Tabela 11 – Deslocamentos químicos obtidos do espectro de NMR no estado sólido do $^{29}\text{Si}$ no polímero da coluna monolítica e suas respectivas atribuições ..... | 84 |

## LISTA DE EQUAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| Equação 1 – Altura do prato em função do número de pratos .....    | 17 |
| Equação 2 – Equação de van Deemter.....                            | 17 |
| Equação 3 – Vazão em função do tempo de retenção da tioureia ..... | 57 |
| Equação 4 – Resolução entre dois pares de picos .....              | 64 |
| Equação 5 – Número de pratos por metro da coluna.....              | 68 |
| Equação 6 – Regressão linear da curva analítica .....              | 76 |
| Equação 7 – Limite de quantificação do analito .....               | 77 |
| Equação 8 – Limite de detecção do analito.....                     | 77 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

|           |   |
|-----------|---|
| ACN       | acetonitrila  |
| AIBN      | 2,2'-azobis(2-metilpropionitrila)   |
| BM        | benzil metacrilato  |
| $C_p$     | concentração do padrão adicionado   |
| $C_s$     | concentração da amostra   |
| $C^4D$    | detector condutométrico sem contato acoplado capacitivamente<br>( <i>capacitively coupled contactless conductivity detector</i> ) |
| CE        | eletroforese capilar ( <i>capillary electrophoresis</i> )   |
| CEC       | eletrocromatografia capilar ( <i>capillary electrochromatography</i> )  |
| CLC       | cromatografia a líquido capilar ( <i>capillary liquid chromatography</i> )  |
| CZE       | eletroforese capilar de zona ( <i>capillary zone electrophoresis</i> )  |
| $D_m$     | coeficiente de difusão do analito   |
| $d_p$     | diâmetro da partícula   |
| GC        | cromatografia a gás ( <i>gas chromatography</i> )   |
| H         | altura do prato   |
| $H_{max}$ | altura máxima do pico   |
| $H_{min}$ | altura mínima do pico   |
| HCl       | ácido clorídrico  |
| HPA       | hidrocarbonetos policíclicos aromáticos   |
| HPLC      | Cromatografia líquida de alta eficiência ( <i>high performance liquid chromatography</i> )  |
| $L_t$     | comprimento total da coluna   |
| LC        | cromatografia a líquido ( <i>liquid chromatography</i> )  |
| LD        | limite de detecção  |
| LQ        | limite de quantificação   |
| MEKC      | cromatografia eletrocinética micelar ( <i>micelar electrokinetic chromatography</i> )   |
| MeOH      | metanol   |
| MPTMS     | 3-(metacriloxiopropil)-trimetoxisilano  |
| N         | número de pratos  |
| NaOH      | hidróxido de sódio  |

|                    |   |
|--------------------|---|
| NH <sub>4</sub> Ac | acetato de amônio   |
| NMR                | ressonância magnética nuclear ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )         |
| r <sub>ic</sub>    | raio interno do capilar   |
| R <sub>s</sub>     | resolução entre dois pares de picos   |
| RSD                | desvio padrão relativo  |
| SEM                | microscopia eletrônica de varredura ( <i>scanning electron microscopy</i> ) |
| S <sub>r</sub>     | desvio padrão do ruído da linha base  |
| TMS                | tetrametilsilano  |
| t <sub>R</sub>     | tempo de retenção   |
| TSP                | capilar com revestimento de poliimida                                       |
| TSU                | capilar com revestimento de fluoropolímero                                  |
| u <sub>fm</sub>    | velocidade linear da fase móvel   |
| UV                 | ultravioleta  |
| W                  | largura do pico   |
| W <sub>1/2</sub>   | largura do pico a meia altura   |

## SUMÁRIO

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>14</b> |
| 1.1          | CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO .....  | 15        |
| 1.2          | ELETROCROMATOGRAFIA CAPILAR .....  | 18        |
| 1.3          | FASES ESTACIONÁRIAS MONOLÍTICAS .....  | 20        |
| <b>1.3.1</b> | <b>Fases estacionárias monolíticas à base de sílica.....</b>   | <b>23</b> |
| <b>1.3.2</b> | <b>Fases estacionárias monolíticas à base de polímeros orgânicos</b>   | <b>24</b> |
| <b>1.3.3</b> | <b>Fases estacionárias monolíticas híbridas .....</b>  | <b>24</b> |
| <b>1.3.4</b> | <b>Fotopolimerização in situ de fases estacionárias monolíticas.....</b>   | <b>27</b> |
| 1.4          | CARACTERIZAÇÃO DA HOMOGENEIDADE DO MATERIAL<br>POLIMÉRICO .....  | 28        |
| <b>2</b>     | <b>OBJETIVOS .....</b>   | <b>31</b> |
| 2.1          | OBJETIVOS GERAIS .....   | 31        |
| 2.2          | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 31        |
| <b>3</b>     | <b>METODOLOGIA .....</b>   | <b>32</b> |
| 3.1          | REAGENTES, PADRÕES E AMOSTRAS.....   | 32        |
| 3.2          | MATERIAIS E EQUIPAMENTOS .....   | 32        |
| 3.3          | PREPARO DAS COLUNAS MONOLÍTICAS .....  | 34        |
| <b>3.3.1</b> | <b>Preparo das colunas monolíticas fotopolimerizadas .....</b>   | <b>34</b> |
| <b>3.3.2</b> | <b>Preparo das colunas monolíticas termopolimerizadas .....</b>  | <b>37</b> |
| <b>3.3.3</b> | <b>Armazenamento das colunas monolíticas .....</b>   | <b>37</b> |
| 3.4          | PROCEDIMENTO PARA A CARACTERIZAÇÃO NÃO INVASIVA DE<br>COLUNAS MONOLÍTICAS COM DETECTOR CONDUTOMÉTRICO              | 38        |
| 3.5          | PROCEDIMENTO GERAL PARA ANÁLISES EM CROMATOGRAFIA A<br>LÍQUIDO E ELETROCROMATOGRAFIA CAPILAR .....                 | 40        |
| 3.6          | PROCEDIMENTO PARA OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE NMR NO<br>ESTADO SÓLIDO DO <sup>13</sup> C E DO <sup>29</sup> Si ..... | 41        |
| <b>4</b>     | <b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>   | <b>43</b> |
| 4.1          | CARACTERIZAÇÃO NÃO INVASIVA DE COLUNAS MONOLÍTICAS   | 43        |
| <b>4.1.1</b> | <b>Avaliação macroscópica de colunas monolíticas .....</b>   | <b>43</b> |
| <b>4.1.2</b> | <b>Avaliação microscópica de colunas monolíticas<br/>termopolimerizadas.....</b>                                   | <b>46</b> |

|              |   |           |
|--------------|---|-----------|
| <b>4.1.3</b> | <b>Avaliação microscópica de colunas monolíticas fotopolimerizadas</b>  | <b>50</b> |
| <b>4.1.4</b> | <b>Avaliação de colunas monolíticas usando o detector condutométrico.....</b>   | <b>51</b> |
| 4.2          | CORRELAÇÃO ENTRE PRESSÃO APLICADA E VAZÃO DE FASE MÓVEL PARA CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO CAPILAR .....                                | 55        |
| 4.3          | ANÁLISE QUALITATIVA DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO CAPILAR.....                           | 60        |
| <b>4.3.1</b> | <b>Comparação entre CLC e CEC na análise de HPAs .....</b>  | <b>66</b> |
| <b>4.3.2</b> | <b>Modificação da coluna monolítica com benzil metacrilato.....</b>   | <b>69</b> |
| 4.4          | ANÁLISE QUALITATIVA DE ESTRIOL, 17- $\beta$ -ESTRADIOL E PROGESTERONA POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO CAPILAR..                       | 71        |
| 4.5          | ANÁLISE QUANTITATIVA DE ESTRIOL E 17- $\beta$ -ESTRADIOL EM AMOSTRA DE EMULSÃO TRANSDÉRMICA POR ELETROCROMATOGRAFIA CAPILAR ..... | 75        |
| 4.6          | ANÁLISE DE NMR NO ESTADO SÓLIDO DO $^{13}\text{C}$ NO POLÍMERO DA COLUNA MONOLÍTICA .....   | 78        |
| 4.7          | ANÁLISE DE NMR NO ESTADO SÓLIDO DO $^{29}\text{Si}$ NO POLÍMERO DA COLUNA MONOLÍTICA .....  | 81        |
| <b>5</b>     | <b>CONCLUSÕES .....</b>   | <b>86</b> |
|              | <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>89</b> |



## 1 INTRODUÇÃO

Uma das áreas mais importantes, com grande reconhecimento e interesse em Química Analítica é, sem dúvida, a de separação. Há mais de um século, novas técnicas e metodologias de análise nessa direção vêm sendo aperfeiçoadas e implementadas. Diante de uma amostra que seja uma mistura de duas ou mais espécies químicas que apresentam propriedades semelhantes frente a um determinado sistema de detecção é comum que se recorra a alguma técnica de separação capaz de separar entre si as espécies de interesse (analitos) na presença ou não de outras espécies interferentes (constituintes da matriz), seja para análises qualitativas ou quantitativas. As técnicas cromatográficas, como a cromatografia a líquido (LC, *liquid chromatography*) e a cromatografia a gás (GC, *gas chromatography*), são as mais importantes técnicas de separação. Ambas adotam uma fase estacionária que deve interagir de maneira distinta entre diferentes espécies químicas que, para serem separadas ao longo dela, são carregadas por uma fase móvel (VON MÜHLEN; LANÇAS, 2004).

Contudo, não pode-se deixar de citar a eletrocromatografia capilar (CEC, *capillary electrochromatography*), que utiliza princípios de separação tanto da cromatografia, devido à presença de uma fase estacionária e uma fase móvel, quanto da eletroforese capilar (CE, *capillary electrophoresis*), técnica de separação baseada nas diferenças de velocidade de eletromigração entre diferentes espécies químicas e que realiza o bombeamento da fase móvel através de um fluxo eletrosmótico (SEGATO; SILVA; JARDIM, 2009).

Existem diversos tipos de fases estacionárias estão dispostas em forma de coluna. As colunas comumente usadas em LC são do tipo empacotadas, ou seja, partículas esféricas compactadas no interior de um tubo. Atualmente busca-se obter o melhor desempenho cromatográfico com a redução das dimensões da coluna, tanto em seu diâmetro quanto na produção de partículas cada vez menores e mais uniformes para aumentar a área superficial que suporta os sítios de interação (SILVA; COLLINS; BOTTOLI, 2011).

Além disso, a miniaturização das técnicas analíticas também é uma estratégia quando se pensa na “química verde” por causa da redução dos

impactos ambientais gerados pelo baixo consumo de solventes e reagentes, redução de custos e tempo de análise (DE LA GUARDIA; GARRIGUES, 2012)

Apesar de ser possível obter partículas menores do que 2  $\mu\text{m}$  de diâmetro, há um aumento da resistência ao fluxo de fase móvel pela fase estacionária devido à redução dos espaços entre as partículas, necessitando elevada pressão para bombeamento da fase móvel. As fases estacionárias monolíticas - estruturas unitárias, contínuas e porosas - são uma alternativa interessante, pois são de fácil preparo, apresentam boa permeabilidade para a fase móvel e podem possuir elevada área superficial (SVEC, 2010).

Um sistema miniaturizado de cromatografia a líquido capilar (CLC, *capillary liquid chromatography*) exige instrumentação que forneça vazões de fase móvel e sistemas de injeção de amostra que sejam coerentes com o diâmetro da coluna, além de conexões livres de volume morto e celas de detecção para nano-volumes (VISSERS, 1997; NOGA *et al.*, 2007; PRÖFROCK, 2010). Devido à escassez de fabricantes e necessidade de importação, os equipamentos comerciais disponíveis atualmente no mercado brasileiro são naturalmente caros.

A dificuldade encontrada está na limitação da instrumentação para vazões de fase móvel e volumes de injeção muito pequenos. Uma alternativa viável seria usar o equipamento de CE, o qual possui um sistema de pressurização por gás comprimido capaz de bombear e injetar líquidos através de um capilar contendo uma fase estacionária monolítica (ROUX *et al.*, 2007; ZHONG; EL RASSI, 2009).

Nesta tese de doutorado abordou-se o preparo de fases estacionárias monolíticas para separações cromatográficas em escala capilar envolvendo CLC e CEC utilizando um equipamento de CE. Dessa forma, será apresentada adiante uma breve introdução sobre essas duas técnicas e sobre as fases estacionárias monolíticas.

## 1.1 CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO

A LC é um sistema de separação constituído por uma fase móvel líquida que elui por uma fase estacionária fixa levando à distribuição dos solutos entre

ambas as fases devido às diferenças de interação dos solutos em cada uma delas. A natureza da fase estacionária e os tipos de equilíbrios dos analitos entre as fases definem cinco tipos de LC: partição, adsorção, troca-iônica, afinidade e exclusão por tamanho. As principais vantagens da LC são a alta seletividade, reprodutibilidade e a eficiência de separação de uma vasta gama de compostos iônicos e moleculares. Tais vantagens renderam à LC o status de técnica analítica de separação mais utilizada nos últimos anos do século passado (SKOOG *et al.*, 2005).

Não existe atualmente um consenso em relação à classificação das técnicas de LC. No entanto Chervet *et al.* (1996) sugeriu uma classificação levando em consideração a vazão da fase móvel e o diâmetro interno da coluna conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação de técnicas de cromatografia a líquido

| <b>Diâmetro interno da<br/>coluna (<math>\mu\text{m}</math>)</b> | <b>Vazão da fase móvel<br/>(<math>\mu\text{L}/\text{min}</math>)</b> | <b>Classificação</b> |
|--|--|----------------------|
| 3200-4600  | 500-2000   | HPLC convencional    |
| 1500-3200  | 100-500  | HPLC microbore       |
| 500-1500   | 10-100   | Micro-LC             |
| 150-500  | 1-10   | LC capilar           |
| 10-150   | 0,01-1   | Nano-LC              |

Fonte: ADAPTADO DE CHERVET *et al.* (1996)

A técnica mais utilizada de LC é a cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC, *high performance liquid chromatography*) com colunas de separação com até 4,6 mm de diâmetro e fase estacionária comumente formada por empacotamento de partículas esféricas de diâmetro entre 3 e 5  $\mu\text{m}$ . Utiliza um sistema de alta pressão (em torno de 500 bar) sem pulsos para bombear a fase móvel (MALDANER; COLLINS, 2010).

Embora a HPLC convencional seja amplamente utilizada, o desempenho cromatográfico através da eficiência de separação pode ser melhorado com a redução das dimensões da coluna bem como a produção de partículas cada vez mais uniformes e menores. Além disso, também é conveniente a possibilidade de introdução de menores volumes de amostra, a redução do consumo de

solventes, a menor geração de resíduos e a redução significativa do tempo de análise (MUHLEN; LANÇAS, 2004).

Quando se assume que a coluna possa ser visualizada como uma divisão de seções imaginárias chamadas de pratos, a eficiência de separação é dada pelo número de pratos (N). Quando o comprimento total ( $L_t$ ) da coluna é dividido por N, obtém-se a altura do prato (H), conforme a Equação 1:

Equação 1 – Altura do prato em função do número de pratos

$$H = \frac{L_t}{N}$$

A cada prato a partição do soluto entre a fase móvel e a fase estacionária é rápida e o equilíbrio é alcançado antes do soluto se mover para o próximo prato. A magnitude dos efeitos cinéticos sobre a eficiência da coluna depende do tempo de contato entre a fase móvel e a fase estacionária, que por sua vez depende da vazão da fase móvel. Assim, estudos de eficiência de uma coluna são realizados determinando-se H em função da velocidade linear da fase móvel ( $u_{fm}$ ). Uma maneira de se fazer isso é através da equação de van Deemter (Equação 2), que pode ser escrita da seguinte forma simplificada:

Equação 2 – Equação de van Deemter

$$H = A \times d_p + \frac{B \times D_m}{u_{fm}} + \frac{C \times d_p^2 \times u_{fm}}{D_m}$$

onde  $d_p$  é o diâmetro da partícula,  $D_m$  é o coeficiente de difusão do analito e os termos A, B e C são constantes. O termo A relaciona-se ao alargamento dos picos devido aos diferentes caminhos percorridos pelo soluto, o termo B à difusão longitudinal do soluto na fase móvel e o termo C à transferência de massa do soluto entre a fase móvel e a fase estacionária.

Como H é inversamente proporcional a N, quanto menor o valor de H, mais eficiente é a separação. Uma vez que A e C estão relacionados com as dimensões das partículas da fase estacionária, reduzir o tamanho das partículas formadoras da fase estacionária reduziria o valor de H e permitiria obter, a princípio, maiores eficiências de separação. Assim, técnicas como micro-LC, LC-

capilar e nano-LC ganham cada vez mais espaço no cenário das separações analíticas (MALDANER; JARDIM, 2009).

O bombeamento da fase móvel pode ser realizado por diferentes tipos de bomba: i) As bombas de seringa acionada por rosca apresentam baixa capacidade de solvente e a troca desse se torna inconveniente, porém a vazão é facilmente controlável e não geram pulsação; ii) As bombas recíprocas, devido ao movimento de pistões, geram um fluxo pulsado que deve ser atenuado posteriormente, mas permitem trabalhar com vazões constantes e eluição gradiente, independentes da queda de pressão imposta pela coluna e variação da viscosidade da fase móvel. A maioria dos equipamentos operam com esse sistema, pois além das vantagens já citadas, permitem trabalhar sob elevada pressão de saída (até 10000 psi). O custo desse sistema é mais elevado do que o anterior; iii) As bombas pneumáticas são um alternativa de baixo custo e operam pressurizando um reservatório de solvente através de um gás comprimido. Por isso, a pressão de saída é bem limitada. São simples e livres de pulsação, porém a vazão depende da viscosidade do solvente e não é possível realizar eluição gradiente (SKOOG et al., 2005).

Esse último tipo de bomba é comumente encontrado em equipamentos de CE para realizar injeção de amostra e fluxo de líquidos pelo capilar vazio, mas pode ser adaptado para realizar eluição de fase móvel em colunas capilares usadas em CLC e CEC (ROUX et al., 2007; ZHONG; EL RASSI, 2009).

## 1.2 ELETROCROMATOGRAFIA CAPILAR

A CEC é uma técnica de separação que opera em meio líquido no interior de tubos capilares contendo uma solução eletrolítica como fase móvel e uma fase estacionária. Assim como em LC, os mecanismos que governam as separações em CEC também dependem da maneira como determinada espécie interage com as fases móvel e estacionária. Todavia, esses mecanismos podem ser auxiliados por fenômenos de eletromigração que são bem descritos nas teorias de CE.

A CE é uma técnica que utiliza uma solução eletrolítica para separar íons solvatados, espécies ionizáveis e compostos neutros na presença de um campo

elétrico, que resulta na migração com velocidades eletroforéticas diferenciadas definidas pela relação entre carga e tamanho de cada espécie. Em geral, uma característica dessa técnica é a presença de um fluxo eletrosmótico oriundo do arraste do solvente a partir da migração dos cátions solvatados do eletrólito em direção ao catodo (eletrodo negativo), o que é favorecido pelo uso de capilares de sílica fundida e eletrólitos com  $\text{pH} > 3$ .

Quando a velocidade eletrosmótica (velocidade do fluxo eletrosmótico) é maior que a velocidade eletroforética de determinada espécie, essa é arrastada em direção ao catodo, tornando possível orientar ânions, cátions e espécies neutras para uma mesma região do capilar, possibilitando sua detecção em um ponto comum (TAVARES, 1997).

O modo de separação mais comum em CE é denominado eletroforese capilar de zona (CZE, *capillary zone electrophoresis*), em que a concentração do eletrólito é constante em toda a região de separação. Ao longo dessa região, os diferentes íons se separam em zonas distintas, porém, as diferentes espécies neutras permanecem em uma única zona. Essa é uma limitação desse modo, que é a incapacidade de separar as espécies neutras entre si.

Alternativamente podemos citar o modo de separação por cromatografia eletrocínica micelar (MEKC, *micelar electrokinetic chromatography*) em que uma pseudo fase estacionária é obtida a partir de tensoativos iônicos que formam micelas carregadas no eletrólito. As micelas migram lentamente em direção ao detector e os analitos neutros apresentam interações de partição diferenciadas com as fases de eletrólito (hidrofílica) e pseudoestacionária (hidrofóbica), possibilitando a separação. Entretanto, a MEKC possui algumas desvantagens que limitam a sua utilização, principalmente a limitada capacidade de picos (intervalo de tempo entre o soluto não retido e o soluto totalmente retido pela micela) e a utilização de tensoativos, que podem comprometer os sistemas de detecção por espectrometria de massas (SATINDER; MOHAMEDILIAS, 2008).

Dessa forma, podemos dizer que a CEC é uma técnica híbrida que traz características tanto da LC quanto da CE. Em termos práticos utiliza-se a instrumentação da CE incluindo um capilar contendo em seu interior uma fase estacionária típica das técnicas cromatográficas e um eletrólito que atua como fase móvel. Em CEC a fase móvel contendo os analitos e o eletrólito é forçada,

pela aplicação de um campo elétrico gerador do fluxo eletrosmótico, a eluir pelo capilar contendo a fase estacionária. A separação se dá tanto pela migração com velocidade diferenciada dependente da carga e tamanho do analito, como pelas diferenças de interação dos analitos com a fase estacionária e a fase móvel.

O fluxo eletrosmótico, característico da CE, elimina a necessidade da aplicação de pressão para prover a eluição da fase móvel, embora em alguns casos possa ser auxiliado por pressão. O fluxo eletrosmótico tem um perfil planar contrastando com o perfil parabólico do fluxo gerado por pressão em LC e não contribui de maneira significativa para os efeitos de alargamento de banda. Em adição a isso, os princípios cromatográficos possibilitam a separação de moléculas neutras, o que não é possível quando se utiliza técnicas eletroforéticas como a CZE (PATERSON; BOUGHTFLOWER, 2000; SEGATO *et al.*, 2009).

### 1.3 FASES ESTACIONÁRIAS MONOLÍTICAS

As fases estacionárias empregadas nas técnicas de separação cromatográficas podem ser um sólido, um líquido (adsorvido ou ligado a um sólido) ou um gel e são fixadas em um suporte inerte localizado sobre uma superfície planar ou tubular, podendo o suporte ser a própria superfície ou um material particulado depositado sobre ela. No caso em que a fase estacionária está sob a forma de um material particulado compactado preenchendo o interior de um tubo, temos a denominação de coluna recheada ou coluna compactada. Quando o tubo tem sua parede interna revestida por uma camada de fase estacionária, temos a denominação de coluna tubular aberta. Além disso, a fase estacionária no interior do tubo pode ser um leito contínuo, unitário e poroso denominado coluna monolítica.

As colunas recheadas são o tipo mais utilizado em LC e o recheio é geralmente preparado a partir de partículas de sílica com diâmetros altamente uniformes recobertas com filmes orgânicos, os quais são quimicamente ou fisicamente ligados à superfície. Comumente as partículas são esferas de diâmetro entre 3 e 5  $\mu\text{m}$  compactadas em colunas de 4,6 mm de diâmetro. Já as colunas tubulares abertas requerem preferencialmente capilares com dimensões bastante reduzidas (entre 50 e 200  $\mu\text{m}$ ). Nesse caso, uma fina camada de fase

estacionária com espessura de poucos décimos de micrometros é fixada na parede interna do capilar recobrando uniformemente o seu interior.

Embora seja possível obter colunas recheadas com partículas de diâmetros inferiores a 2  $\mu\text{m}$  e utilizar colunas tubulares abertas em capilares de dimensões bastante reduzidas, alguns obstáculos são encontrados. Um deles é o aumento da resistência ao fluxo da fase móvel devido à redução da permeabilidade com o uso de partículas muito pequenas, que acaba por gerar elevada pressão de retorno que pode danificar a coluna e até o restante do equipamento.

Nesse contexto, a CEC é uma técnica que vem ganhando espaço, pois a fase móvel está associada aos fenômenos do fluxo eletrosmótico, o qual elimina o problema de pressão de retorno gerada nos equipamentos de LC, mas ainda existe outra dificuldade que está no próprio enchimento do capilar com material particulado, necessitando a criação de filtros para reter as partículas no interior do capilar, favorecendo a perda de reprodutibilidade e formação de bolhas em análises por CEC.

No caso das colunas tubulares abertas, a dificuldade está em obter filmes de fase estacionária com espessura uniforme ao longo de toda a parede do capilar, além de apresentar pequena área superficial.

Tendo em vista essas dificuldades, as colunas monolíticas passaram a ser bastante empregadas nas separações cromatográficas por apresentarem algumas características interessantes, como preparo relativamente fácil, boa permeabilidade da fase móvel e elevada área superficial contendo os sítios de interação (HILDER; SVEC; FRÉCHET, 2004; FARIA *et al.*, 2006).

As fases estacionárias monolíticas podem ser definidas como um leito contínuo, unitário e poroso pelo qual elui a fase móvel e se encontra normalmente na forma cilíndrica no interior de um tubo, daí a denominação de coluna monolítica.

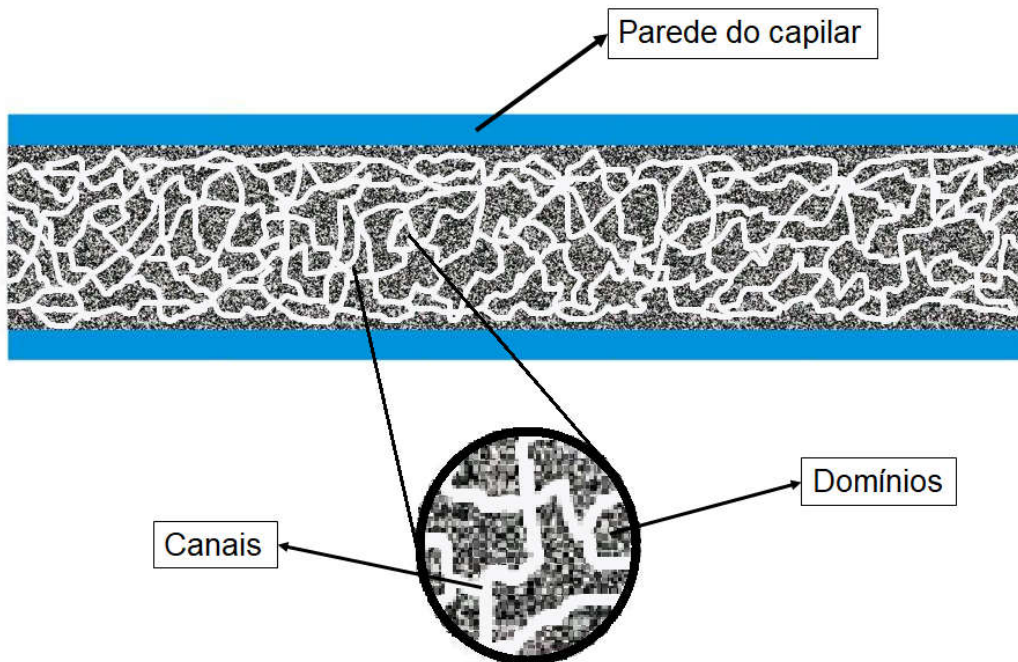
Embora estruturas monolíticas tenham sido anteriormente aplicadas nas ciências de separações, o primeiro aparecimento do termo "monólito" nesse sentido surgiu em 1993 na separação de proteínas em uma esponja de celulose funcionalizada. Similarmente, a expressão "monolítica" foi relacionada com polímeros rígidos macroporosos preparados por polimerização grosseira em um molde fechado e tornou-se rapidamente um padrão (SVEC *et al.*, 2003).



A partir dos anos 2000 e principalmente na década atual as colunas monolíticas ganharam expressivo interesse e estão sendo muito bem aproveitadas nas técnicas cromatográficas miniaturizadas. O interesse está em seu preparo relativamente fácil, permitirem boa permeabilidade da fase móvel e possuírem elevada área superficial, que propicia separações eficientes, (WU *et al.*, 2011).

As colunas monolíticas são constituídas pelos domínios (esqueleto de sílica ou glóbulos de polímero orgânico) e longos canais que são os espaços vazios entre os domínios. A boa permeabilidade para a fase móvel é resultado da presença desses canais com dimensões próximas de 1  $\mu\text{m}$ . A Figura 1 apresenta uma ilustração exemplificando uma coluna monolítica no interior de um tubo capilar, apontando para os domínios e os canais.

Figura 1 – Ilustração exemplificando uma coluna monolítica no interior de um tubo capilar



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

É desejável que a fase estacionária monolítica apresente grande área superficial e conseqüentemente um grande número de sítios de interação, o que

permite obter elevada eficiência de separação. Isso é conseguido com a incorporação de um grande número de pequenos poros que são encontrados nos domínios da fase estacionária monolítica. De acordo com suas dimensões, esses poros podem ser denominados como microporos (menores que 2 nm), mesoporos (entre 2 e 50 nm) e macroporos (maiores que 50 nm). A porosidade depende do monômero de entrecruzamento, da temperatura e do tempo de polimerização, mas principalmente do agente porogênico (FARIA *et al.*, 2006).

A facilidade de preparo se deve ao fato das colunas monolíticas poderem ser preparadas *in situ*, ou seja, diretamente no interior de tubos capilares, sem a necessidade de filtros para reter o material, pois este pode se fixar nas paredes internas. Existem três tipos básicos de colunas monolíticas de acordo com a natureza da matriz química que pode ser baseada em sílica, baseada em polímeros orgânicos ou ser um híbrido desses dois tipos.

### **1.3.1 Fases estacionárias monolíticas à base de sílica**

O principal método de preparo das colunas baseadas em sílica é pelo processo sol-gel a partir da policondensação hidrocatalítica de um alcóxissilano (tetrametoxissilano, por exemplo) na presença de um polímero orgânico solúvel em água como modelador dos poros (agente porogênico). O processo se desenvolve com o ganho de viscosidade da mistura passando de um sol para um gel, acompanhado por uma separação de fases na qual o agente porogênico perde sua solubilidade no meio, formando os poros. Subsequentemente ocorre uma etapa de envelhecimento do gel com lenta evaporação do excesso de solvente no interior dos poros completando os processos de hidrólise e condensação e aumentando as interligações entre cadeias poliméricas. Por fim, é necessária uma etapa de secagem para remoção completa da fase líquida formada pelo solvente, reagentes, catalisadores e produtos de reação (SIOUFFI, 2003).

### 1.3.2 Fases estacionárias monolíticas à base de polímeros orgânicos

Para as colunas baseadas em polímeros orgânicos, o preparo ocorre a partir da polimerização de um ou mais tipos de monômeros (geralmente estirenos, metacrilatos e acrilamidas) em uma mistura contendo um agente de entrecruzamento e um iniciador de polimerização, tudo na presença de um ou mais solventes porogênicos. A polimerização é feita por adição radicalar e pode ser termoiniciada (por aquecimento) ou fotoiniciada (por radiação UV) (ZOU *et al.*, 2002). Geralmente a termoiniciada requer tempos muito maiores de polimerização. O agente porogênico atua na solvatação das cadeias poliméricas no meio reacional nos primeiros estágios da polimerização e nesse caso a formação dos poros depende da separação de fases quando a solubilidade dos núcleos poliméricos diminui (SVEC, 2010).

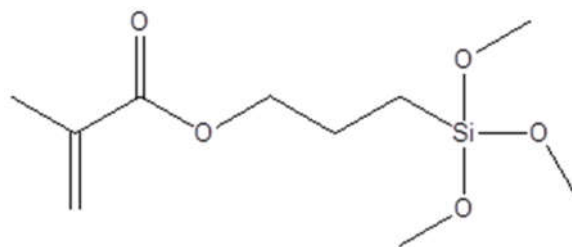
### 1.3.3 Fases estacionárias monolíticas híbridas

É crescente o desenvolvimento de colunas híbridas que buscam acumular características positivas das outras duas. As colunas baseadas em polímeros orgânicos são mais estáveis à variação de pH e podem apresentar uma grande diversidade de superfícies químicas possíveis de se obter devido à variedade de monômeros disponíveis para o processo de polimerização. Entretanto, sofrem desgaste mecânico devido a sucessivos intumescimentos e encolhimentos provocados por alguns solventes, gerando perda de repetibilidade nas análises nas quais são empregadas. Já as baseadas em sílica são mais resistentes a esse desgaste mecânico, mas são comprometidas em pH fora da faixa de estabilidade da sílica (pH entre 2 e 8), pois as ligações siloxanas (Si-O-Si) são mais vulneráveis ao ataque hidrolítico em  $\text{pH} < 2$  e  $\text{pH} > 8$ .

As colunas híbridas podem ser preparadas a partir de um alcóxissilano organofuncionalizado, como o 3-(metacriloxipropil)-trimetoxissilano (MPTMS), por exemplo, que contém um grupo metacrilato (Figura 2). O MPTMS é um monômero que tem sido utilizado como modificador da parede interna do capilar para permitir a ancoragem de materiais orgânicos na parede inorgânica

(POSTHUMUS; MAGUSIN, 2004). Entretanto, poucos trabalhos tratam do MPTMS como um monômero constituinte principal da matriz polimérica (ZHENG *et al.*, 2007).

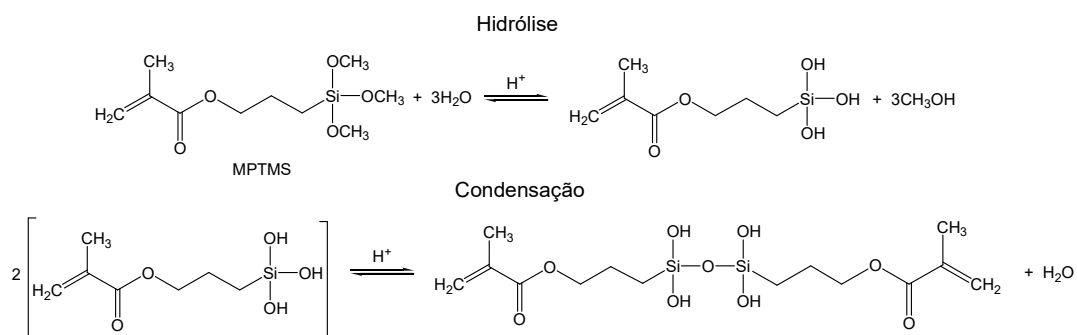
Figura 2 – Estrutura do monômero 3-(metacriloxipropil)-trimetoxissilano (MPTMS)



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A polimerização desse tipo de monômero envolve dois processos químicos diferentes: (i) polimerização sol-gel, com hidrólise e condensação dos grupos alcoxissilanos (Figura 3) e (ii) polimerização radicalar dos grupos metacrilatos (LI; FRIES; MALIK, 2004). Após a policondensação dos monômeros com formação de oligômeros, a estrutura formada passa a ter vários pontos para a polimerização e reticulação a partir dos grupos metacrilatos que possuem uma ligação  $\pi$  para a adição radicalar (VAZ *et al.*, 2012).

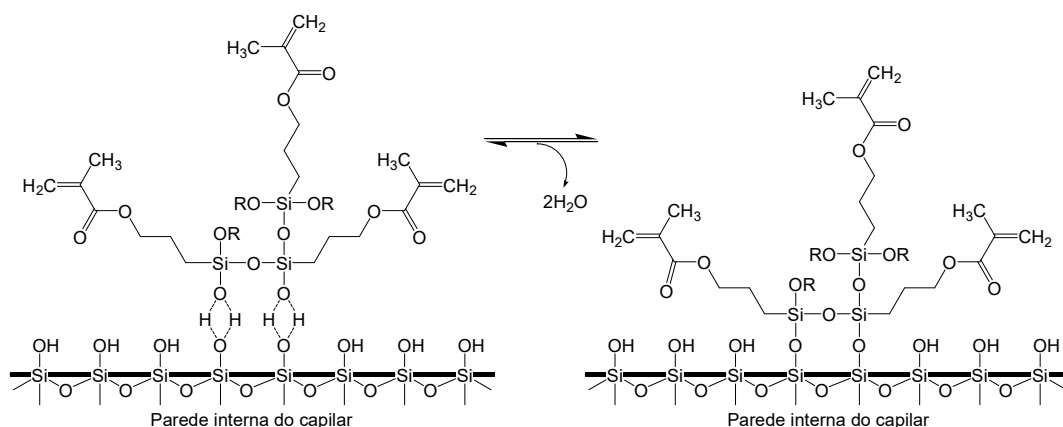
Figura 3 – Etapas de hidrólise e condensação do 3-(metacriloxipropil)-trimetoxissilano levando à formação de um dímero



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Dessa forma são obtidas colunas com ligações covalentes entre partes orgânicas e inorgânicas, como as ligações sílica-carbono hidroliticamente mais estáveis. A parte orgânica pode conferir à fase estacionária monolítica características hidrofóbicas, o que levaria o sistema eletrocromatográfico a atuar como fase reversa, em que a fase estacionária é apolar e a fase móvel polar. Além disso, esse tipo de monômero serve como uma interface entre a parede do capilar e a matriz polimérica, permitindo a ancoragem da fase estacionária (Figura 4).

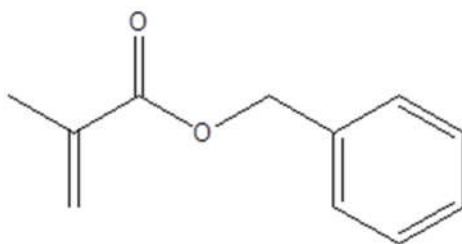
Figura 4 – Esquema mostrando a ancoragem de um trímero formado a partir do 3-(metacriloxipropil)-trimetoxissilano à parede interna do capilar de sílica



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Além disso, pode ser possível realizar a modificação do polímero utilizando monômeros com grupos metacrilatos, como o benzil metacrilato (Figura 5). O processo deve ocorrer por adição radicalar a partir da ligação  $\pi$  entre os grupos metacrilatos do MPTMS e do benzil metacrilato.

Figura 5 – Estrutura do monômero benzil metacrilato

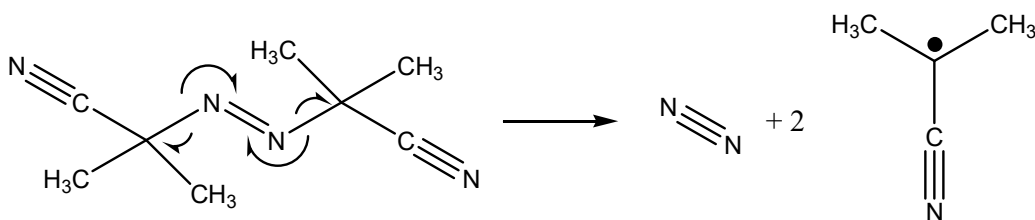


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

### 1.3.4 Fotopolimerização *in situ* de fases estacionárias monolíticas

As colunas monolíticas podem ser produzidas pela polimerização de um monômero diretamente no interior do capilar (*in situ*) e o conjunto passa a se denominar coluna monolítica (GUSEV; HUANG; HORVATH, 1999). A grande maioria dos trabalhos envolvendo colunas monolíticas utiliza o processo de termopolimerização, sendo o 2,2'-azobis(2-metilpropionitrila) (AIBN) o principal iniciador de polimerização utilizado (Figura 6). Em geral, os processos envolvendo termopolimerização são mais demorados e requerem um rigoroso controle do tempo e da temperatura (ANDROVIČ; BARTÁČEK; SEDLÁK, 2016).

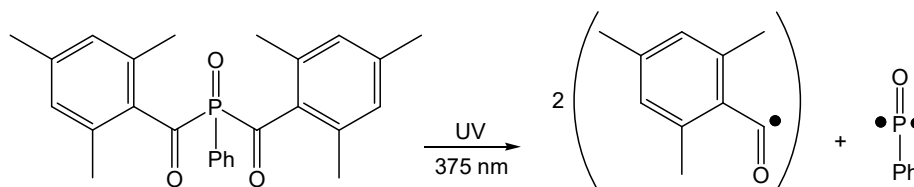
Figura 6 – Formação de radicais a partir do 2,2'-azobis(2-metilpropionitrila)



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Uma alternativa são os processos de fotopolimerização, como por exemplo, os que utilizam como iniciador o óxido de fenilbis(2,4,6-trimetilbenzoil)fosfina que gera radicais ao absorver radiação em comprimento de onda característico, ou seja, 375 nm (Figura 7). Após a geração dos radicais a polimerização se propaga por adição radicalar às ligações do tipo  $\pi$  do monômero.

Figura 7 – Formação de radicais a partir da fotólise do óxido de fenilbis(2,4,6-trimetilbenzoil)fosfina



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A fotopolimerização *in situ* necessita que o material do capilar seja transparente à radiação utilizada na fotólise do iniciador. Os capilares de sílica fundida comumente são revestidos externamente com poliimida, que confere robustez mecânica ao capilar, mas não é transparente à radiação UV.

Como alternativa, existem capilares revestidos externamente com fluoropolímero ou com poliacrilato, transparentes a uma determinada faixa da radiação UV. Capilares revestidos com poliacrilato já foram utilizados com sucesso no preparo de colunas monolíticas (VAZ *et al.*, 2008a). Entretanto, os capilares com poliacrilato se mostraram relativamente quebradiços e com variações consideráveis em seu diâmetro interno.

Os capilares revestidos com fluoropolímero (série TSU da *Polymicro Technologies*) são transparentes à radiação UV, permitindo a fotopolimerização da fase estacionária monolítica. A série TSU tem transparência maior que 90% a 214 nm, região do espectro em que muitos analitos são detectados, o que elimina a necessidade de remoção do revestimento para criar uma janela óptica de detecção, sendo essa uma vantagem. Esse tipo de capilar permite o controle visual do preenchimento do capilar com a mistura polimérica, a fotopolimerização *in situ* e a avaliação da homogeneidade macroscópica do monólito.

#### 1.4 CARACTERIZAÇÃO DA HOMOGENEIDADE DO MATERIAL POLIMÉRICO

Como as colunas monolíticas são produzidas *in situ*, só é possível observar a qualidade do material polimérico formado após a coluna estar pronta.

Não é o caso das colunas empacotadas, por exemplo, em que o material particulado pode ser avaliado antes de recheiar a coluna.

Apesar dos capilares do tipo TSU serem transparentes e, inclusive, ser possível visualizar o monólito formado em seu interior, pequenas variações em sua homogeneidade são difíceis de serem observadas a olho nu. Um microscópio óptico pode ser utilizado com essa finalidade. Ainda assim, em alguns casos, variações pontuais podem ser difíceis de serem distinguidas e detectadas visualmente, devido a própria limitação do observador.

Uma forma de verificar a qualidade do monólito de forma mais precisa é a utilização da microscopia eletrônica de varredura (SEM, *scanning electron microscopy*). Porém, essa técnica requer que a coluna seja fragmentada em diversos segmentos para que seja visualizada ponto a ponto, ou seja, a coluna precisa ser destruída para ser observada no equipamento. Esse procedimento é útil quando se quer ter um conhecimento geral sobre as características dos monólitos, como dimensão de cavidades, distância entre unidades estruturais, dentre outras, mas o custo do equipamento é bastante elevado (AGGARWAL; TOLLEY; LEE, 2012).

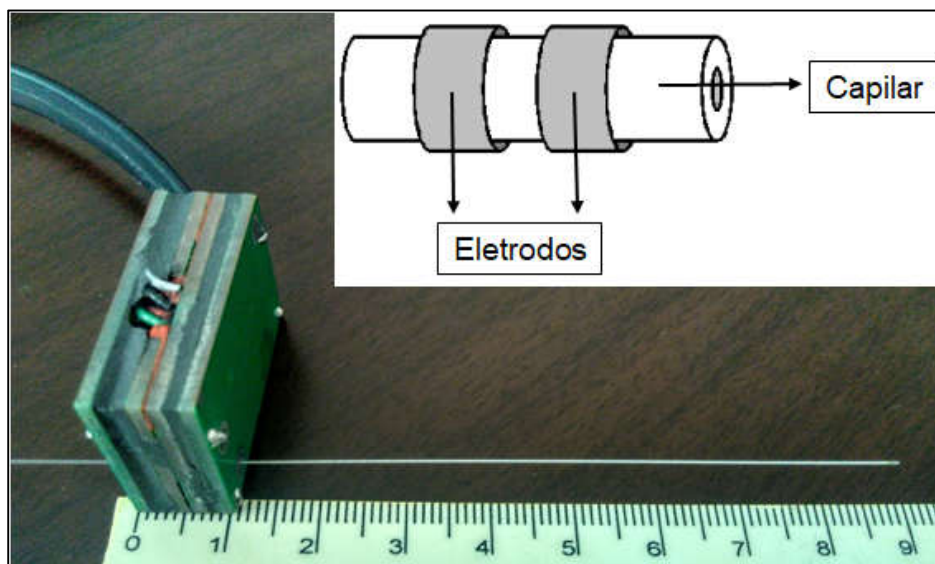
Uma alternativa elegante e de baixo custo para avaliar apenas a homogeneidade física da coluna, evitando sua destruição, seria pela implementação do uso de detectores condutométricos sem contato acoplados capacitivamente (C<sup>4</sup>D, *capacitively coupled contactless conductivity detection*). Embora não tenham sido projetados com esse intuito, mas sim como um sistema de detecção para separações analíticas envolvendo eletromigração, esse tipo de detector pode ser utilizado como *scanner* não invasivo na verificação da homogeneidade física ou química ao longo da coluna de forma relativamente rápida possibilitando que todas as colunas produzidas sejam avaliadas (CONNOLLY et al., 2007, 2010).

Silva e Lago (1998) e Zemmann et al. (1998) introduziram, de forma independente, a detecção condutométrica sem contato, ou detecção oscilométrica, como sistema de detecção alternativo em análises envolvendo CZE. Em termos práticos, uma cela oscilométrica consiste em dois eletrodos em forma de anel de modo que um capilar com diâmetro externo em torno de 360 µm possa passar no interior dos anéis (Figura 8). Os eletrodos são separados por uma distância fixa e uma corrente alternada é aplicada em um dos eletrodos



a uma frequência otimizada. O circuito pode ser fechado entre os dois eletrodos através de uma solução eletrolítica contida no capilar. Não há necessidade de contato físico entre os eletrodos e a solução devido às altas frequências utilizadas. As espécies carregadas do eletrólito permitem a passagem da corrente elétrica proporcionalmente à condutância do meio, ou seja, quanto menor a resistência da solução, maior será a corrente registrada (BRITO-NETO et al., 2005; SILVA; LAGO, 1998; ZEMANN et al., 1998).

Figura 8 – Fotografia de um detector condutométrico posicionado ao longo de um capilar e esquema ilustrando uma cela oscilométrica



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Como a corrente medida é uma propriedade da solução, nenhuma seletividade é encontrada neste tipo de detecção, o que o torna um detector universal. A condutância do meio depende do número de íons, das cargas e da mobilidade de cada íon presente na solução. Espera-se que a variação da quantidade de íons em um determinado volume fixo do capilar gere uma variação do sinal posteriormente convertido em condutividade (SILVA, 2003). Porém, em um capilar preenchido com coluna monolítica, esse volume fixo pode apresentar quantidades diferentes de solução. Assim, torna-se possível identificar regiões no interior de uma coluna monolítica em que a quantidade de solução e, conseqüentemente a quantidade de íons, seja maior devido à baixa quantidade de material polimérico (CONNOLLY et al., 2007, 2010).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Preparar, caracterizar e aplicar fases estacionárias monolíticas fotopolimerizadas para uso em colunas de separação cromatográfica em escala capilar utilizando um equipamento de CE.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar as condições de preparo de fases estacionárias monolíticas baseadas no monômero MPTMS.

Utilizar um C<sup>4</sup>D como *scanner* não invasivo para verificar a homogeneidade e densidade de material polimérico.

Avaliar a aplicabilidade de um equipamento de CE para análises envolvendo CLC.

Otimizar a separação por CLC de uma mistura de cinco hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (naftaleno, acenafteno, fluoreno, antraceno e fenantreno) e de uma mistura de três esteroides (estriol, 17- $\beta$ -estradiol e progesterona).

Aplicar a CEC na análise quantitativa de amostras de emulsão transdérmica contendo associação de estriol e 17- $\beta$ -estradiol.

Caracterizar o polímero pela espectroscopia de NMR no estado sólido dos núcleos <sup>13</sup>C e <sup>29</sup>Si.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 REAGENTES, PADRÕES E AMOSTRAS

Nas etapas de pré-tratamento do capilar e preparo da coluna monolítica foram utilizados: ácido clorídrico (HCl) supra puro - Vetec (Rio de Janeiro, Brasil); hidróxido de sódio (NaOH) P.A. - Labsynth (Diadema, Brasil); metanol (MeOH) P.A. - Quimex (Tubarão, Brasil); (3-metacriloxipropil)-trimetoxisilano - Acros Organics (New Jersey, EUA); óxido de fenilbis(2,4,6-trimetilbenzoil)fosfina; 2,2'-azobis(2-metilpropionitrila); benzil metacrilato - Aldrich (Steinheim, Alemanha); tolueno - Beckman (Fullerton, EUA). Para o preparo da fase móvel: acetonitrila (ACN) e acetato de amônio (NH<sub>4</sub>Ac) P.A. - Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Os padrões utilizados foram: naftaleno, acenafteno (99,0%) - Sigma (Saint Louis, EUA); antraceno (99,0%) e fenantreno (97,0%) - Fluka (Buchs, Suíça); fluoreno (98,0%) - Aldrich (Steinheim, Alemanha); tiouréia P.A. - Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Padrões secundários de estriol (99,61%), 17-β-estradiol (100,23%) e progesterona (99,32%) foram cedidos e rotulados em frascos âmbar pela Ortofarma (Matias Barbosa, Brasil). Uma amostra comercial de emulsão transdérmica contendo associação de estriol (4,0 mg g<sup>-1</sup>) e 17-β-estradiol (1,0 mg g<sup>-1</sup>) foi adquirida para análise quantitativa por CEC.

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água tratada pelo sistema de osmose reversa utilizando o Aparelho de Osmose Reversa - Q842 da Quimis (Diadema, Brasil).

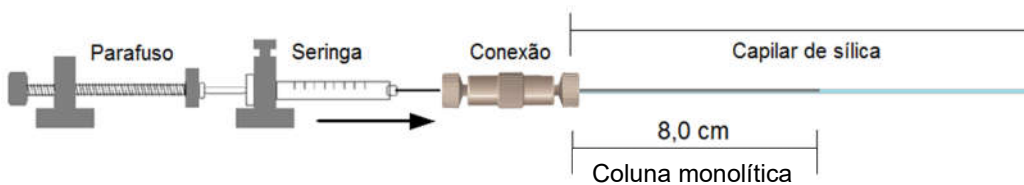
#### 3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Foram utilizados capilares de sílica fundida revestidos externamente com fluoropolímero da série TSU e com poliimida da série TSP, ambos da Polymicro Technologies (Phoenix, EUA). As dimensões dos capilares foram: 100 µm de diâmetro interno e 360 µm de diâmetro externo.

Para o processo de condicionamento do capilar, preenchimento com a solução fotopolimerizável e lavagem da coluna monolítica foram utilizadas

seringas *Gastight* (25  $\mu$ L-1702-RNR) - Hamilton Company (Reno, EUA); seringas descartável (5 mL) - Becton Dickinson (Juiz de Fora, Brasil) uniões do tipo *MicroTight*® (P-720 e P-662) - Upchurch Scientific (Oak Harbor, EUA); e um dispositivo de pressurização *labmade* que permite inserir fluídos no capilar lentamente e com precisão pela seringa (Figura 9).

Figura 9 – Dispositivo de pressurização para controle da inserção de fluídos no capilar



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A fotopolimerização foi realizada em um reator fotoquímico *labmade* equipado com 6 lâmpadas negras de 15 W cada e com emissão predominante em 375 nm (VAZ *et al.*, 2008b). A termopolimerização foi realizada em Banho Térmico com Cuba Redonda - Q218 da Quimis (Diadema, Brasil).

Um C<sup>4</sup>D *labmade* foi utilizado na caracterização não invasiva das colunas monolíticas com o auxílio de um *software* para aquisição e monitoramento de dados baseado na plataforma *LabVIEW 8* da *National Instruments* (FRANCISCO; DO LAGO, 2009).

Um microscópio óptico, com capacidade de ampliar a imagem em até 400 vezes, foi utilizado para verificar a homogeneidade física das colunas monolíticas. Esse microscópio transmite as imagens ao computador através de uma porta USB.

Foi utilizado nas análises cromatográficas e eletrocromatográficas um equipamento de CE da Agilent Technologies, modelo 7100, equipado com fonte de alta tensão ( $\pm$  30 kV), sistema de detecção com arranjo de diodos, controle de temperatura no interior do cartucho por passagem de ar forçado e programa para controle, aquisição e tratamento de dados *Agilent ChemStation* – Rev. B.04.03 (modelo 7100). Foi instalado no aparelho um cilindro de gás nitrogênio

ultrapuro - White Martins (Juiz de Fora, Brasil) para permitir aplicação de pressões entre de 2 e 12 bar.

Os experimentos de NMR no estado sólido do  $^{13}\text{C}$  e do  $^{29}\text{Si}$  foram realizados em um espectrômetro Bruker Avance III HD 300 operado em um campo de 7,05 T. As análises foram executadas em uma sonda CPMAS e rotores de  $\text{ZrO}_2$  (tampas de Kel-F) de 4 mm.

### 3.3 PREPARO DAS COLUNAS MONOLÍTICAS

Foram produzidos três tipos de colunas monolíticas cujas as composições das soluções polimerizáveis que dão origem aos polímeros da fase estacionária estão descritas na Tabela 2. As colunas I e II foram preparadas pelo processo de fotopolimerização usando capilares TSU. A coluna II foi produzida com o intuito de modificar a coluna I com o grupo benzila oriundo do benzil metacrilato para aumentar a hidrofobicidade. A coluna III foi preparada pelo processo de termopolimerização, tanto em capilar TSU quanto em capilar TSP.

Tabela 2 – Composição das soluções polimerizáveis

| Coluna | MPTMS<br>(mL) | $^a\text{HCl}$<br>(mL) | Fotoiniciador<br>(g) | Tolueno<br>(mL) | BM<br>(mL) | AIBN<br>(mL) |
|--------|---------------|------------------------|----------------------|-----------------|------------|--------------|
| I      | 1,537         | 0,463                  | 0,0559               | 8,0             | -          | -            |
| II     | 1,230         | 0,463                  | 0,0559               | 8,0             | 0,307      | -            |
| III    | 1,537         | 0,463                  | -                    | 6,3             | -          | 1,7          |

a:  $\text{HCl}$  0,12 mol  $\text{L}^{-1}$ ; BM: benzil metacrilato

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

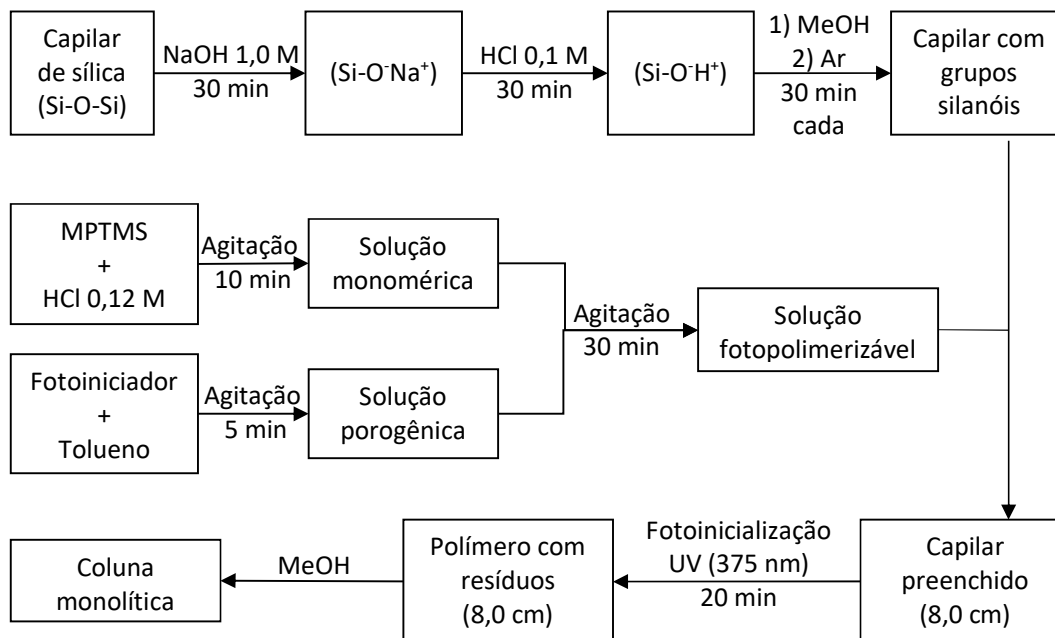
#### 3.3.1 Preparo das colunas monolíticas fotopolimerizadas

As colunas monolíticas fotopolimerizadas foram produzidas seguindo o procedimento descrito por Vaz *et al.* (2012) que está simplificado no fluxograma da Figura 10. Inicialmente os capilares de sílica fundida foram submetidos a um pré-tratamento para ativação dos grupos silanóis da parede interna. Esse

preparo consiste na passagem de fluxos sequenciais de NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup>, HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e metanol, nessa ordem, durante 30 minutos cada. Nessa etapa, a união *MicroTight*® P-662 foi utilizada para conectar o capilar à seringa descartável de 5 mL cujo o êmbolo foi pressurizado pelo dispositivo da Figura 9 fazendo fluir pelo capilar a solução contida em seu interior. Após essa etapa, o interior do capilar foi seco pela passagem de ar.

O MPTMS foi misturado ao catalisador HCl 0,12 mol L<sup>-1</sup>, com 10 minutos de agitação, dando origem à solução monomérica. O fotoiniciador foi solubilizado em tolueno, com agitação de 5 minutos, originando a solução porogênica. Quando se utilizou o benzil metacrilato, este foi adicionado à solução porogênica. As soluções monomérica e porogênica foram misturadas, com agitação de 30 minutos, para obtenção da solução fotopolimerizável.

Figura 10 – Fluxograma do processo de produção das colunas monolíticas



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A solução fotopolimerizável foi deixada em repouso por pelo menos 48 horas para a separação da fase orgânica a qual é utilizada na polimerização. A solução fotopolimerizável foi armazenada em frasco âmbar envolto por papel alumínio. Após esse período, a fase orgânica foi transferida para tubos

Eppendorf de 2 mL e centrifugada a 6000 rpm por 5 min para separar eventuais resíduos de fase aquosa.

A introdução da fase orgânica da solução fotopolimerizável no capilar foi feita de duas formas distintas: i) utilizando o dispositivo de pressurização e ii) utilizando o fenômeno de capilaridade. Em ambos os casos, o controle da inserção da solução no capilar foi feito visualmente até que a solução ocupasse a porção desejada (9,0 cm a partir de uma das extremidades).

Quando o dispositivo de pressurização foi utilizado, a solução foi inicialmente colocada em uma seringa *Gastight* 1702-RNR de 25  $\mu$ L acoplado ao dispositivo e conectada ao capilar através da união *MicroTight*® P-720. O êmbolo da seringa foi então pressionado pelo dispositivo lentamente até que a solução ocupasse a seção desejada do capilar.

No caso do preenchimento por capilaridade, inicialmente uma seringa descartável (5 mL) foi utilizada para remoção do ar do interior do capilar. A seringa foi conectada ao capilar através de uma união *MicroTight*® P-662. O êmbolo da seringa foi puxado até o limite para remoção do ar do capilar. Sem deixar o êmbolo retornar à posição inicial, o capilar foi desconectado da seringa. Esse procedimento foi realizado por três vezes consecutivas. Após isso, o capilar desconectado da seringa foi imerso apenas por uma das extremidades no frasco contendo a solução fotopolimerizável. A Figura 11 mostra uma fotografia com as seringas e conexões utilizadas.

Figura 11 – Fotografia mostrando seringas e conexões utilizadas no preparo das colunas monolíticas



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Depois de preenchido, o capilar foi colocado no reator fotoquímico permanecendo por 20 minutos. Após esse período, os resíduos da reação de polimerização foram removidos do capilar com a passagem de fluxo de metanol utilizando o dispositivo de pressurização. Nessa etapa, foi utilizada a união *MicroTight*® P-720 para conectar o capilar à seringa *Gastight* 1702-RNR de 25 µL contendo o metanol. O tamanho da coluna foi padronizado para 8,0 cm cortando-se 1,0 cm da porção inicial da coluna.

### 3.3.2 Preparo das colunas monolíticas termopolimerizadas

O procedimento para o preparo das colunas monolíticas termopolimerizadas foi bastante semelhante ao das colunas fotopolimerizadas. Contudo, o termoiniciador foi adicionado à mistura porogênica em substituição ao fotoiniciador e a introdução da solução termopolimerizável no capilar foi feita apenas por capilaridade. Além disso, quando foi utilizado o capilar TSP, o preenchimento precisou ser monitorado pelo C<sup>4</sup>D, conforme será discutido posteriormente. Neste caso, o detector foi posicionado na região do capilar selecionada como limite para a solução termopolimerizável e o preenchimento monitorado pela variação da condutividade através do *software*.

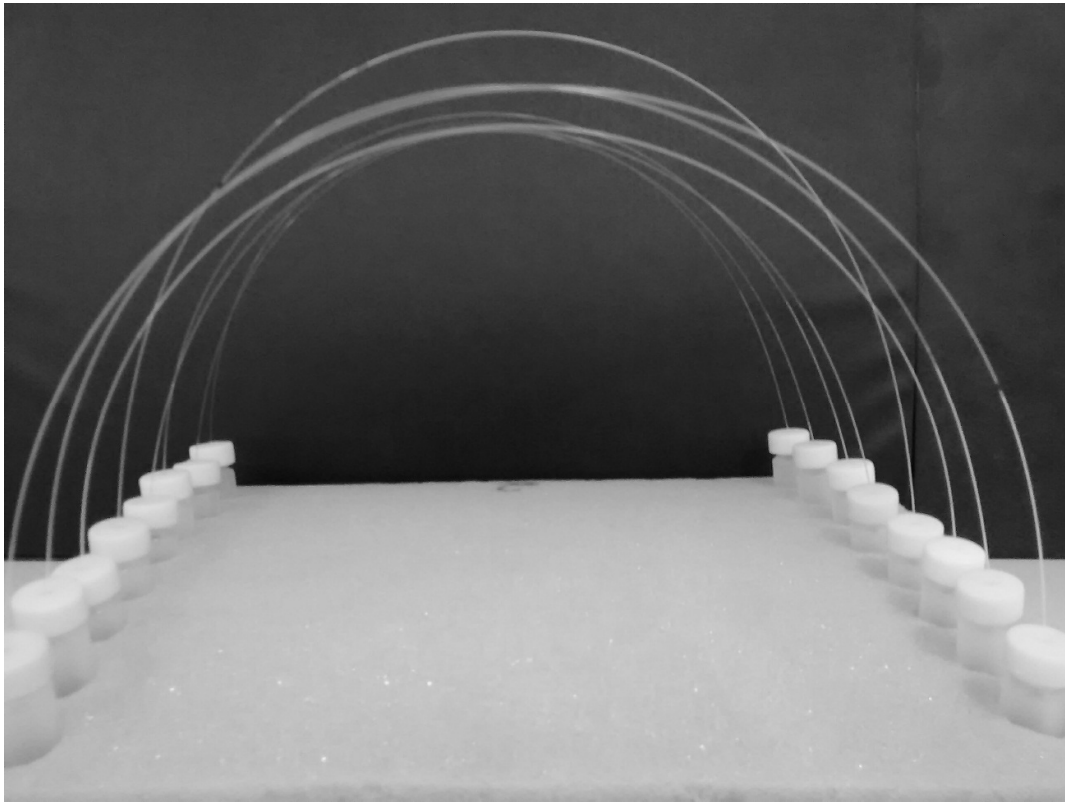
Os capilares preenchidos foram selados nas extremidades com pequenos pedaços de borracha e mergulhados em banho térmico a 60 °C durante 24 horas. Após este período, os resíduos de polimerização foram removidos da mesma forma como foi feito para as colunas fotopolimerizadas.

### 3.3.3 Armazenamento das colunas monolíticas

Os capilares contendo a coluna monolítica precisam ficar preenchidos com um solvente para evitar que o polímero seque e que sucessivos intumescimentos e encolhimentos causem danos físicos ao material. Dessa forma, como mostrado na Figura 12, o capilar preenchido com metanol teve as extremidades imersas em reservatórios contendo o solvente para evitar que o conteúdo do capilar secasse.



Figura 12 – Fotografia mostrando os capilares contendo as colunas monolíticas preenchidas com solvente para serem armazenadas

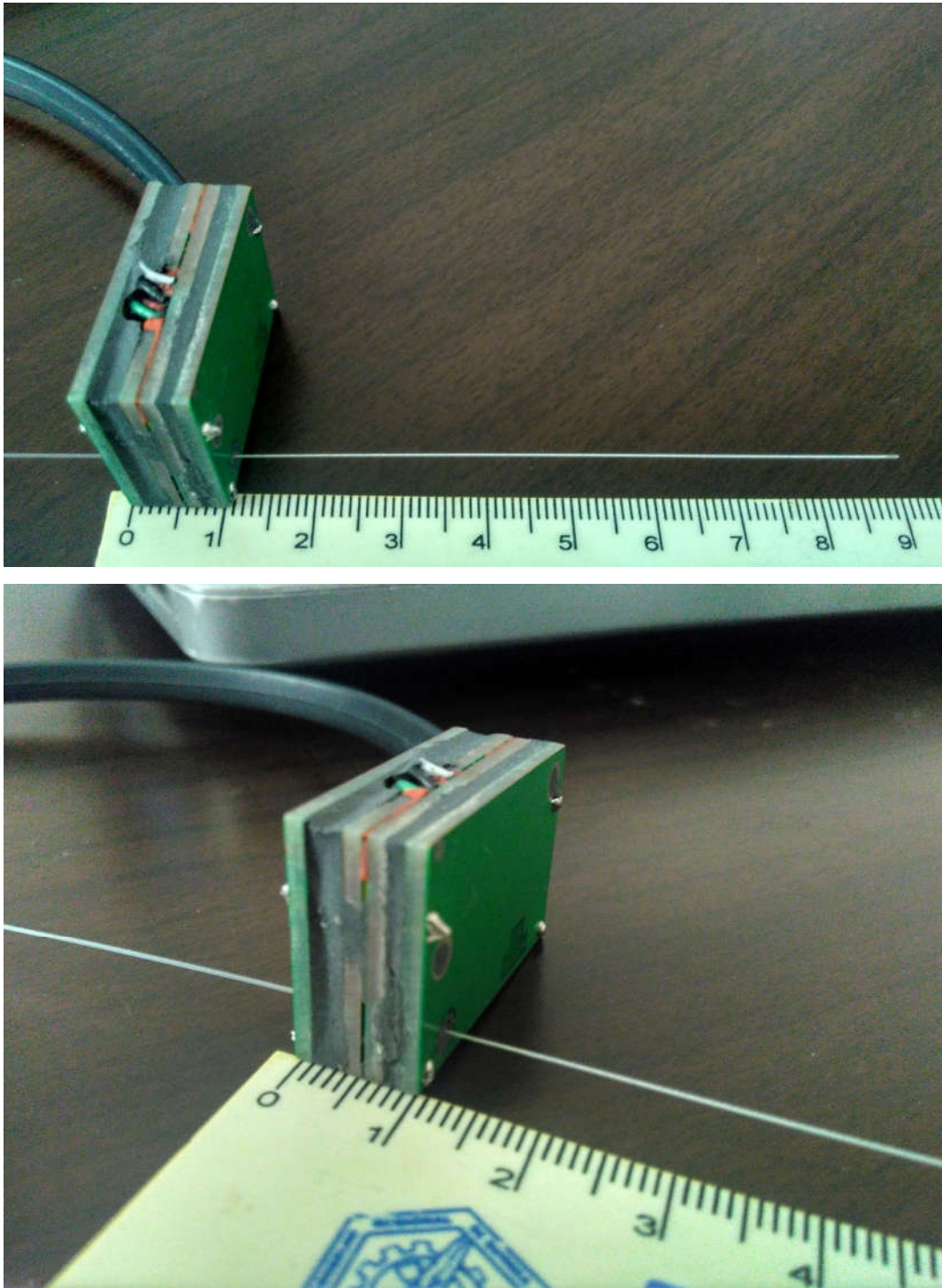


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

### 3.4 PROCEDIMENTO PARA A CARACTERIZAÇÃO NÃO INVASIVA DE COLUNAS MONOLÍTICAS COM DETECTOR CONDUTOMÉTRICO

O procedimento para caracterização não invasiva utilizando o C<sup>4</sup>D como *scanner* consistiu em deslocar o detector ao longo do capilar de 5 em 5 mm a cada 1 minuto. O deslocamento foi feito fora do equipamento de CE puxando-se manualmente uma das extremidades do capilar disposto sobre uma régua. O capilar contendo a coluna monolítica foi preenchido com uma solução eletrolítica constituída de ácido acético 40 mmol L<sup>-1</sup> e 20% de ACN. A Figura 13 mostra uma fotografia do esquema experimental.

Figura 13 – Fotografia do esquema experimental mostrando o posicionamento do detector condutométrico ao longo da coluna monolítica



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

O sinal gerado pode então ser monitorado pelo *software* indicando a condutividade do meio na região da coluna em que o detector está posicionado em determinado instante de tempo. Esses dados são gerados em forma de um gráfico de condutividade em função do tempo.

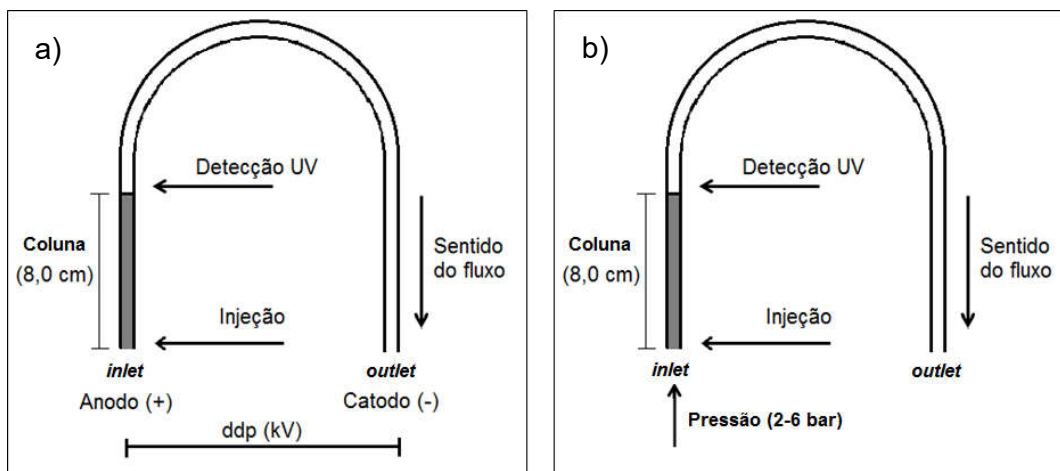
### 3.5 PROCEDIMENTO GERAL PARA ANÁLISES EM CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO E ELETROCROMATOGRAFIA CAPILAR

A coluna monolítica no interior do capilar oferece resistência à passagem de fluxo de fase móvel, soluções ou solventes. Pressões convencionais do equipamento de CE (da ordem de  $10^{-3}$  bar) não são suficientes para vencer essa resistência e dessa forma um sistema de alta pressurização externa a partir de um cilindro de nitrogênio deve ser utilizado. No *software*, a função *highpressure* é usada para pressurização dos reservatórios entre 2 e 12 bar. No caso das análises por CEC essa pressão é utilizada para o condicionamento da coluna e no caso das análises por CLC essa pressão é utilizada também para bombeamento da fase móvel durante as corridas.

A Figura 14 mostra um esquema geral adotado para as análises por CEC e CLC. A coluna monolítica é posicionada imediatamente antes do detector que incide o feixe de luz em uma região livre de fase estacionária, lembrando que o capilar de sílica fundida com revestimento externo de fluoropolímero é transparente à radiação UV, mas o polímero da coluna monolítica não. Todas as soluções e solventes são inseridos no capilar de modo que passem primeiro pela coluna antes de passar pelo detector. Para injeção de soluções de padrões e amostras, o capilar é imerso no reservatório contendo essas soluções e uma pequena pressão é aplicada para entrada de uma certa quantidade no capilar. Depois o capilar é imerso no reservatório contendo a fase móvel e pressurizado para bombeamento da mesma.

Outros procedimentos específicos para cada análise estão descritos ao longo das respectivas seções que tratam dos resultados e discussões.

Figura 14 – Esquema geral de procedimento para as análises



(a) eletrocromatografia capilar e (b) cromatografia a líquido capilar

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

### 3.6 PROCEDIMENTO PARA OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE NMR NO ESTADO SÓLIDO DO $^{13}\text{C}$ E DO $^{29}\text{Si}$

Para realizar as análises de NMR, 4,5 mL da solução fotopolimerizável foram transferidos para uma seringa plástica e levados ao fotoreator por 20 minutos para polimerização. Após o período de polimerização, os polímeros foram lavados com 40 mL de metanol, simulando a lavagem feita com o polímero no capilar (Figura 15).

Antes de ser analisado, o polímero ficou secando a temperatura ambiente durante 72 horas. No equipamento de NMR, a frequência de Larmor foi selecionada em 78,9 MHz para o núcleo de  $^{27}\text{Al}$ , 75,0 MHz para o  $^{13}\text{C}$  e 59,6 MHz para o  $^{29}\text{Si}$ . Os espectros do núcleo de  $^{13}\text{C}$  foram obtidos utilizando giro-ângulo mágico, numa frequência de 3 kHz, e polarização cruzada. Os deslocamentos químicos foram padronizados de forma indireta através de uma amostra de glicina, com sinal referente à carbonila em 176,00 ppm em relação ao TMS que é o padrão primário. Os espectros do núcleo de  $^{29}\text{Si}$  foram realizados numa sequência *one-pulse* desacoplado com o núcleo de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ), tempo de relaxação (d1) foi de 10 s e foram realizadas 3048 aquisições. As amostras foram giradas numa frequência de 5 kHz e uma amostra sólida de

caulinita ( $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$ ) foi utilizada como padrão externo (-91,5 ppm em relação ao padrão primário TMS).

Figura 15 – Fotografias do procedimento de limpeza dos polímeros para análise de NMR



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1 CARACTERIZAÇÃO NÃO INVASIVA DE COLUNAS MONOLÍTICAS**

#### **4.1.1 Avaliação macroscópica de colunas monolíticas**

Geralmente, a primeira avaliação que se faz em uma coluna recém produzida é por uma simples visualização macroscópica a olho nu e irregularidades nas colunas podem passar despercebidas. Tais falhas acabam sendo detectadas apenas quando as colunas já estão sendo utilizadas em alguma análise, através da falta de reprodutibilidade dos tempos de retenção, alargamento de picos, coeluições, dentre outros, o que gera grande prejuízo operacional.

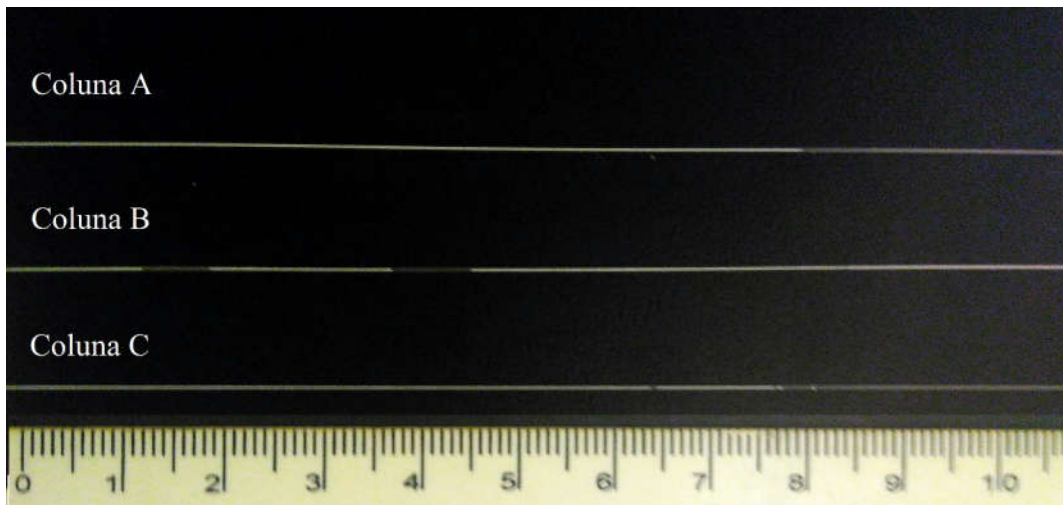
Falhas grosseiras são fáceis de serem observadas. Na fotografia da Figura 16 estão três colunas monolíticas preparadas em capilar TSU. A região do capilar onde está localizada a fase estacionária é branca e opaca, contrastando com a região transparente da região vazia do capilar. A Coluna A ocupa os 8 cm iniciais do interior do capilar e o restante do capilar está vazio internamente. A olho nu podemos dizer que a coluna apresenta excelente homogeneidade física.

Já a Coluna B ocupa uma porção bem maior do capilar e apresenta falhas grosseiras em sua estrutura física que podem ser observadas em torno de 1,5 e 4,0 cm da régua. Provavelmente essas falhas são causadas por deslocamento do material polimérico que não se ancorou adequadamente à parede interna do capilar de sílica. Essa falha na ancoragem pode estar associada a irregularidades na parede interna do capilar ou falhas no processo de condicionamento para exposição dos grupos silanóis.

Na Coluna C notamos uma falha bem discreta e pontual próximo a 6,4 cm da régua. Esse tipo de falha é comum quando há presença de bolhas na solução polimerizável. Aqui é importante ressaltar que nos estágios iniciais da pesquisa, o preenchimento do capilar com a solução polimerizável era feito com seringa através do dispositivo de pressurização. O processo de sucção da solução pela

seringa pode gerar minúsculas bolhas na solução que é transferida. Além disso, pode haver presença de ar na conexão entre a seringa e o capilar. Eventualmente essas bolhas podem ser inseridas no interior do capilar juntamente com a solução polimerizável e, obviamente, ocasiona falhas na estrutura do monólito.

Figura 16 – Fotografia de três colunas monolíticas com diferentes homogeneidades físicas



Coluna A: sem falhas; Coluna B: falhas grosseiras; Coluna C: falha pontual; a graduação da régua é dada em centímetros

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Quando a presença de bolhas foi notada na solução já inserida no capilar, foi necessário remover a solução do capilar e realizar uma limpeza com metanol para remover resíduos da solução, com posterior secagem do interior do capilar com ar. Esse processo consome tempo e nem sempre os resultados são satisfatórios. Muitas vezes a coluna apresentou deslocamento de material, como da Coluna B da Figura 16, ou até mesmo entupimento. Isso pode ter acontecido pela presença de resíduos de metanol no capilar ou até mesmo de solução polimerizável.

Uma alternativa testada com sucesso foi o uso do dispositivo de pressurização de modo inverso, ou seja, o dispositivo puxaria o êmbolo da seringa vazia conectada ao capilar imerso na solução polimerizável como se

esse fosse uma extensão da agulha da seringa. Assim, a solução não passaria por qualquer conexão e evitaria o contato com o ar (RIBEIRO et al., 2015). Embora essa alternativa tenha se mostrado promissora, a montagem do aparato parece ser trabalhosa. O próprio ato de desconectar a seringa do capilar pode gerar diferenças de pressão que fazem o líquido no interior do capilar se deslocar.

Como forma de evitar o uso do dispositivo de pressurização, de seringas e conexões, foi proposto o preenchimento do capilar usando o fenômeno natural de capilaridade que é a propriedade física que os fluidos têm de subir ou descer em tubos extremamente finos. A combinação de tensão superficial, causada pela coesão entre as moléculas do líquido, com a adesão do líquido à superfície desse material, pode fazê-lo subir por ele (ATKINS; DE PAULA, 2009).

Observou-se que a solução polimerizável não é capaz de subir ao longo do capilar naturalmente. A presença de ar dentro do capilar pode dificultar a entrada da solução. Nesse caso, foi necessário remover o ar do interior do capilar com uma seringa para depois realizar o preenchimento. Dessa forma, capilaridade pode não ser a melhor denominação para o fenômeno ocorrido, mas optou-se por utilizá-la aqui por se tratar da entrada de um líquido no interior de um tubo capilar sem pressurização ou sucção auxiliar de forma direta.

Sob essas condições, a solução polimerizável é capaz de subir ao longo do capilar com uma velocidade que permite monitorar seu deslocamento, através do capilar transparente, até o ponto desejado. No caso, o ponto desejável é em torno de 9,0 cm a partir da extremidade do capilar em contato com a solução. Ao atingir o ponto desejado, a extremidade do capilar é removida de dentro da solução. Para esse deslocamento o processo funcionou sem problemas, mas casos com colunas mais longas necessitam ser investigados. Na tentativa de produzir uma coluna de 27,0 cm, por exemplo, o fenômeno de capilaridade não foi suficiente.

O preenchimento por capilaridade se mostrou mais prático e rápido do que o com o dispositivo de pressurização. A solução polimerizável leva cerca de 20 segundos para preencher os 9,0 cm do capilar. Além disso, esse processo eliminou a formação de bolhas na solução polimerizável e o número de colunas com falhas físicas como os das colunas B e C da Figura 16 praticamente reduziu-



se a zero. Dessa forma, todas as colunas passaram a ser produzidas a partir desse processo.

#### **4.1.2 Avaliação microscópica de colunas monolíticas termopolimerizadas**

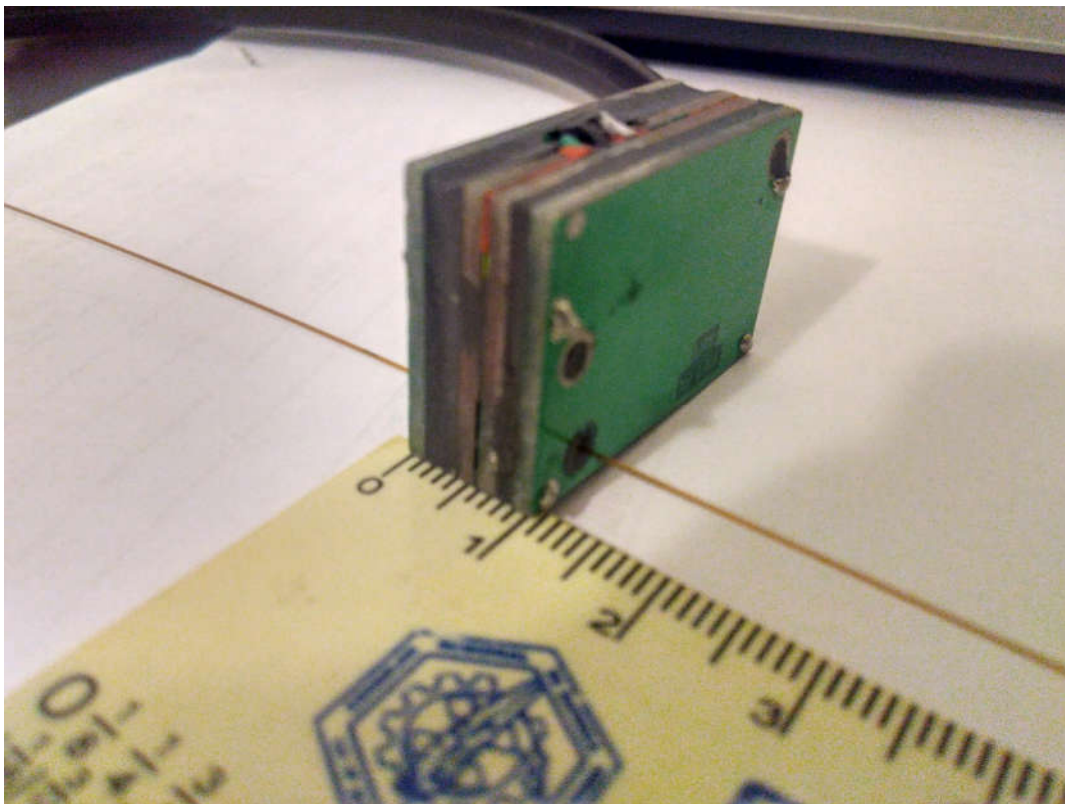
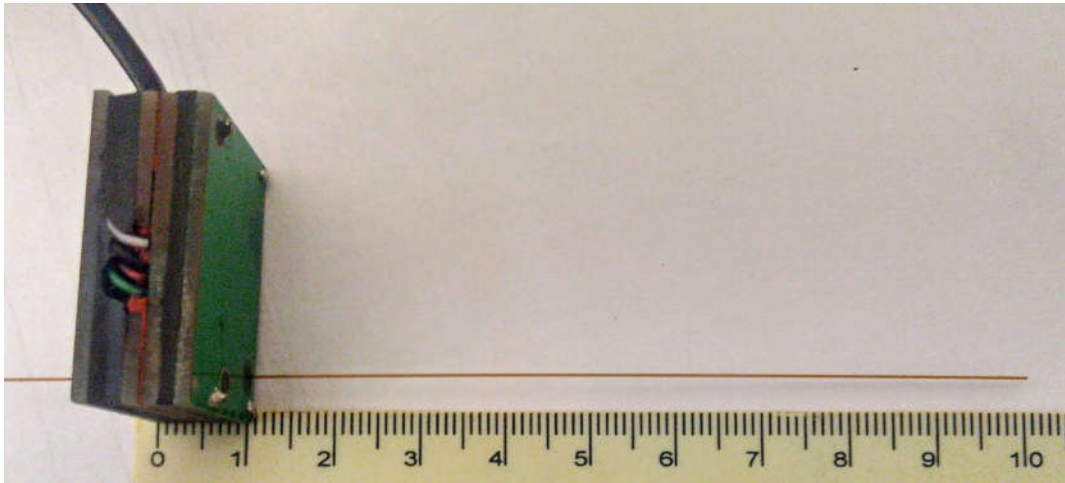
Para produzir colunas monolíticas a partir do processo de fotopolimerização é necessário que o revestimento externo do capilar de sílica fundida seja transparente à radiação usada no processo de fótólise do agente iniciador da polimerização. Os capilares que abrangem essa categoria, como os denominados comercialmente como TSU, podem ser encontrados no mercado, porém seu custo é mais elevado do que os capilares de sílica revestidos com poliimida (TSP). Além disso, como os capilares TSU são menos comuns no mercado brasileiro, existe uma certa dificuldade para importá-los.

Neste cenário em que os capilares TSP são mais acessíveis, embora não sejam transparentes, é desejável a termopolimerização como uma opção para o preparo de colunas monolíticas. Como forma de iniciar os estudos envolvendo termopolimerização, foi proposto uma composição polimérica (Tabela 2) substituindo o iniciador de polimerização óxido de fenilbis(2,4,6-trimetilbenzoil)fosfina por um iniciador amplamente usado no processo de termopolimerização, o 2,2'-azobis(2-metilpropionitrila) (SVEC; 2010).

Quando o capilar é transparente, o processo de preenchimento pode ser monitorado visualmente observando a solução deslocando-se pelo capilar. O próprio polímero formado pode ser observado a olho nu no capilar TSU, porém, no capilar TSP, essa não é uma realidade.

Como as colunas monolíticas ocupam apenas uma porção do capilar (o restante do capilar fica vazio), foi proposto o monitoramento do preenchimento do capilar através de um C<sup>4</sup>D. Neste caso, o detector foi posicionado na região do capilar selecionada como limite para a solução termopolimerizável (Figura 17) e o preenchimento monitorado pela variação da condutividade através do *software*. Foi considerado o meio do detector como ponto de medição e 9,0 cm o espaço do capilar a ser preenchido.

Figura 17 – Fotografia mostrando o posicionamento do C<sup>4</sup>D no capilar TSP para monitorar o preenchimento

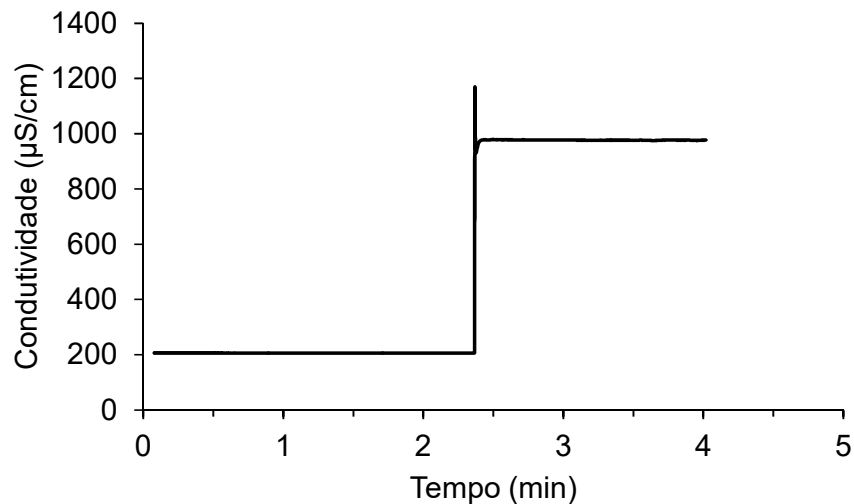


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Na Figura 18 temos o gráfico gerado com os dados do C<sup>4</sup>D. Após acionado o detector, foi dado um tempo de cerca de 2 minutos para estabilização da linha base e após esse período a extremidade do capilar foi inserida na solução termopolimerizável. Por volta dos 2,4 minutos o detector acusou uma

variação de condutividade, indicando que a solução chegou ao ponto desejado. Imediatamente, a extremidade do capilar foi removida da solução. Esse mesmo procedimento foi feito usando capilar TSU para verificar se a solução realmente atingia o ponto desejado. Uma vez que esse capilar é transparente, foi possível observar isso visualmente.

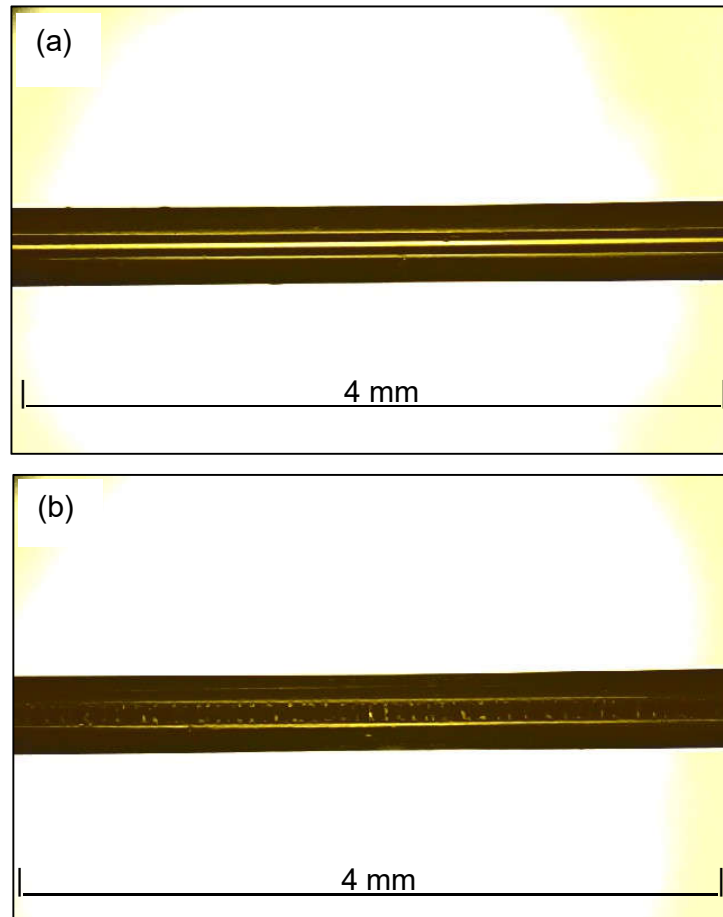
Figura 18 – Gráfico de condutividade em função do tempo indicando o preenchimento do capilar



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Após o preenchimento, as extremidades do capilar foram seladas com pedaços de borracha. O capilar foi então colocado em banho térmico a 60 °C durante 24 horas. Após esse período, a coluna foi limpa com metanol. Tanto capilares TSP quanto TSU passaram por esse processo. No capilar TSU foi possível verificar visualmente o polímero formado no interior do capilar. No capilar TSP, a visualização a olho nu da formação do polímero foi duvidosa. Como alternativa, um microscópio óptico foi usado. Na Figura 19 podemos observar um capilar TSP vazio e outro com a coluna monolítica formada pelo processo de termopolimerização.

Figura 19 – Imagem de microscópio óptico mostrando um capilar TSP vazio e outro com coluna monolítica



a) capilar TSP vazio e b) capilar TSP com coluna monolítica termopolimerizada

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

É importante ressaltar que a composição da solução termopolimerizável bem como as condições de polimerização, como tempo e temperatura, precisam ser estudadas e otimizadas. Além disso, essas colunas termopolimerizadas ainda precisam ser colocadas a prova em separações capilares por CEC e CLC. Entretanto, esse estudo não será mostrado aqui. Os resultados apresentados daqui em diante serão todos referentes a colunas fotopolimerizadas em capilar TSU.

#### **4.1.3 Avaliação microscópica de colunas monolíticas fotopolimerizadas**

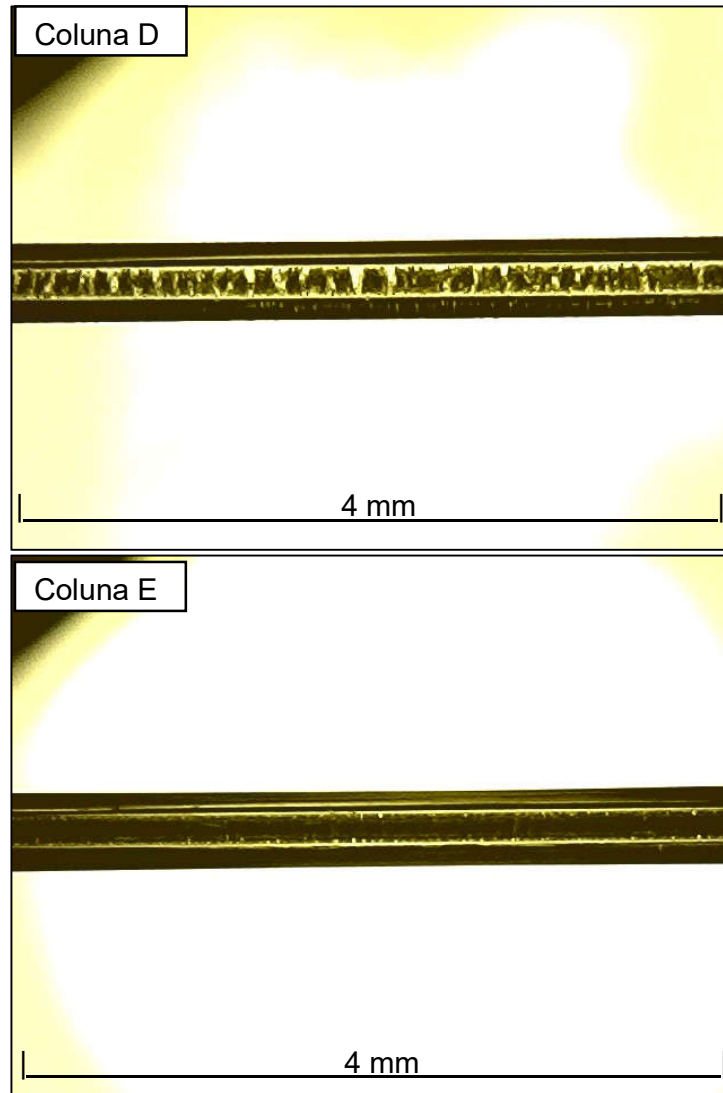
Como foi discutido anteriormente, alguns detalhes no preparo da coluna monolítica podem alterar sua homogeneidade física, que em alguns casos não pode ser detectável a olho nu. Um desses detalhes é a separação de fases da solução fotopolimerizável. A maior parte da solução é constituída por tolueno, mas existe uma pequena fração aquosa proveniente da solução de HCl. Para a polimerização, interessa a fase contendo os monômeros e o fotoiniciador, no caso, a fase orgânica.

A separação de fases ocorre naturalmente, mas uma pequena fração da fase aquosa pode ficar dispersa na fase orgânica em uma emulsão. Quando isso acontece, a presença de água pode alterar a porosidade do material durante o processo de polimerização, uma vez que os solventes da mistura polimérica atuam como modeladores de poros (SVEC, 2010).

Era esperado, portanto, que a centrifugação da solução fotopolimerizável separasse por completo eventuais resíduos de fase aquosa na fase orgânica e reduzisse a quantidade de falhas na coluna monolítica. Isso pode ser comprovado mediante a avaliação da densidade de material polimérico da coluna monolítica através da análise de uma imagem de microscópio óptico. Nesse sistema, uma luz de fundo é utilizada para gerar um contraste com o material polimérico.

Na Figura 20, a coluna D representa uma coluna em que a solução fotopolimerizável não foi centrifugada e a coluna E uma em que houve centrifugação. A densidade de material da coluna E é maior do que a da coluna D. Considerando que o experimento foi feito em triplicata e que em todos os casos esse resultado se repetiu, a centrifugação da solução fotopolimerizável é um fator importante no processo de produção das colunas monolíticas.

Figura 20 – Imagem de microscópio óptico de colunas monolíticas mostrando a diferença quando a solução fotopolimerizável é centrifugada



Coluna D: sem centrifugação da solução fotopolimerizável; Coluna E: com centrifugação da solução fotopolimerizável

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

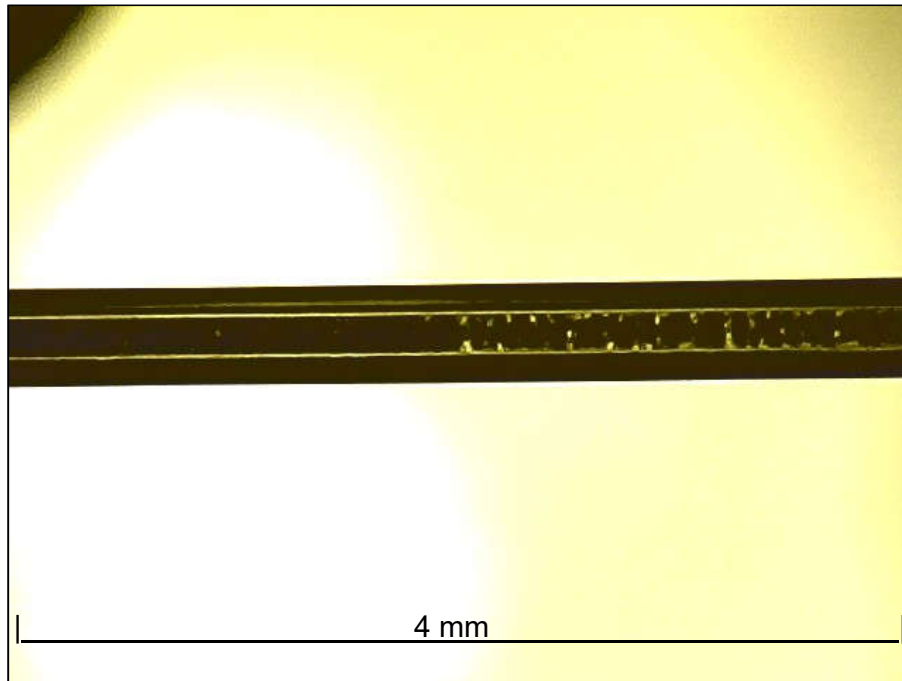
#### 4.1.4 Avaliação de colunas monolíticas usando o detector condutométrico

Uma maneira elegante de se fazer o monitoramento da homogeneidade seria pela implementação do uso de C<sup>4</sup>D como *scanner* não invasivo. Esse tipo de detector pode ser utilizado na verificação da homogeneidade física ou química

ao longo da coluna de forma relativamente rápida possibilitando que todas as colunas produzidas sejam avaliadas, sem destruí-las de forma invasiva.

Para demonstrar a aplicabilidade desse sistema, um microscópio óptico foi utilizado de forma a auxiliar na identificação visual de possíveis regiões da coluna em que a densidade de material polimérico sofresse alteração. Esse tipo de situação está exemplificado na imagem de microscópio da Figura 21. Podemos notar que a região mais à esquerda da coluna, o material se apresenta bastante denso, sem falhas. Já a região mais à direita, é possível notar falhas na coluna.

Figura 21 – Imagem de microscópio óptico de uma coluna monolítica com variação da densidade de material polimérico

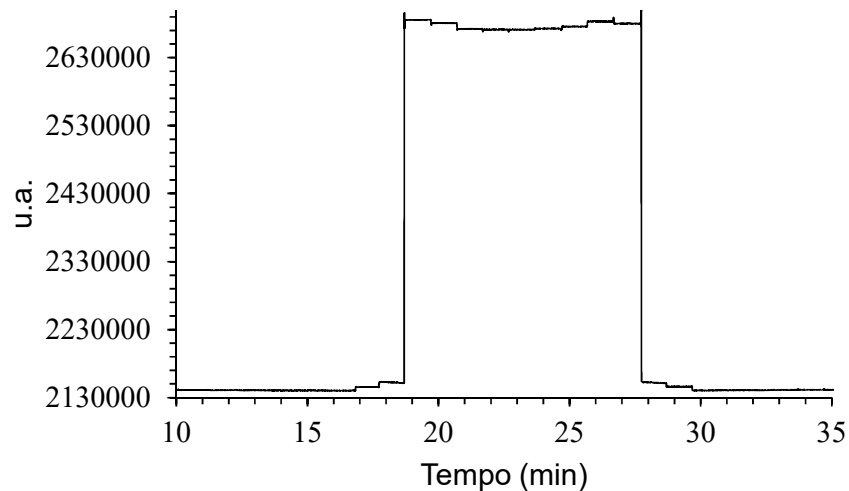


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Mesmo que o microscópio auxilie na identificação de variações na densidade de material, não é possível garantir que a porção mais interna da região da coluna mais à esquerda na Figura 21 não apresenta falhas, uma vez que a luz de fundo possa estar sendo bloqueada apenas pela porção mais externa. Da mesma forma, outras pequenas variações podem não ser possíveis de serem visualizadas.

Nesse sentido, o C<sup>4</sup>D apresentaria melhor sensibilidade, como apresentado no gráfico da Figura 22. Esse gráfico mostra a variação da condutividade, em unidades arbitrais, no interior do capilar em uma região com coluna monolítica, mais especificamente a região que abrange a seção apresentada na imagem da Figura 21.

Figura 22 - Gráfico de condutividade em função do tempo mostrando variações da densidade de material polimérico ao longo de uma coluna



Obs.: 10-19 min, região com alta densidade de material; 19-28 min, região com baixa densidade de material; 28-35 min, região com alta densidade de material

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Os primeiros 10 minutos da análise foram utilizados para estabilização da linha base. Após esse período, o detector foi deslocado ao longo do capilar em 5 mm a cada 1 minutos. A partir de 17 minutos o detector acusa uma pequena variação de sinal. Outra pequena variação é notada aos 18 minutos. Uma grande variação no sinal acontece aos 19 minutos, exatamente quando o detector se posiciona na região com baixa densidade de material. Outras pequenas variações são notadas aos 20 e 21 minutos. Aos 23 minutos praticamente não ocorre variação do sinal. Nesse momento o detector passou a ser deslocado no sentido inverso para confirmar os resultados anteriores.

Considere como volume total a região do capilar compreendida entre os eletrodos do detector. O volume ocupado pela solução eletrolítica é o volume



total menos o volume ocupado pelo material polimérico. Em uma região com baixa densidade de material, o volume ocupado pela solução eletrolítica é maior. Consequentemente, a quantidade de espécies carregadas dentro do volume total também aumenta. A condutância do meio depende do número de íons, das cargas e da mobilidade de cada íon presente na solução. Então, a variação do volume ocupado pela solução eletrolítica gera uma variação do sinal convertido em condutividade.

De fato, a utilização do C<sup>4</sup>D como um *scanner* capaz de identificar regiões com variações longitudinais de densidade de material em colunas monolíticas foi reportada na literatura (CONNOLLY et al., 2007). Porém, foi reportada uma situação drástica em que falhas no polímero foram forjadas, levando a grande diferença de densidade de material. Aqui, foi possível identificar falhas discretas e não previsíveis.

Enquanto a grande variação de sinal aos 19 minutos pode ser relacionada à imagem da Figura 21, que mostra a diferença de densidade de material, as pequenas variações de sinal podem ser explicadas pela presença de regiões com pequenas variações de densidade de material. Tais variações não são possíveis de ser identificadas por uma imagem de microscópio óptico.

Esse resultado é promissor também para o caso em que se deseja produzir novos sistemas de fases estacionárias monolíticas. Nesse caso, densidade de material ou mesmo a porosidade precisam ser investigadas no processo de otimização da composição da solução polimerizável e outras condições de preparo.

Além disso, os dados de densidade de material obtidos a partir do C<sup>4</sup>D podem ser correlacionados à performance de separação das colunas monolíticas no que diz respeito à sua capacidade de retenção de analitos. Por exemplo, colunas com alta densidade podem apresentar um tempo maior de retenção.

## 4.2 CORRELAÇÃO ENTRE PRESSÃO APLICADA E VAZÃO DE FASE MÓVEL PARA CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO CAPILAR

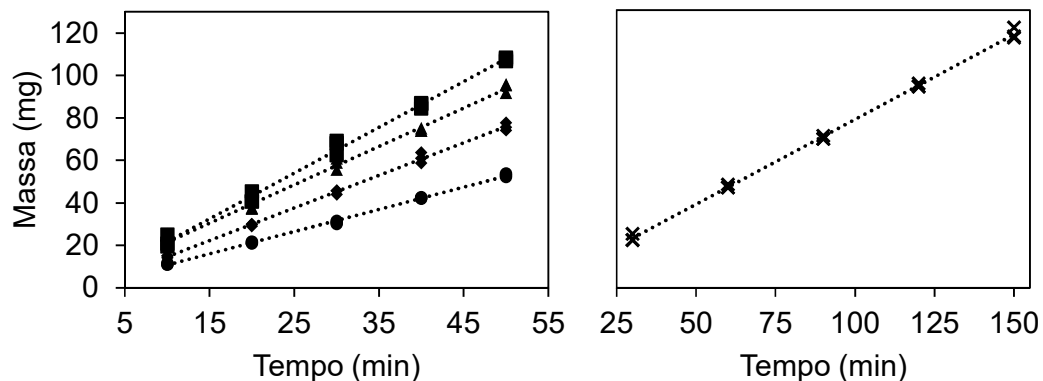
Para utilizar as colunas monolíticas como colunas de CLC no equipamento de CE é necessário inicialmente fazer uma correlação entre a pressão aplicada para bombear a fase móvel e a vazão de fase móvel. A vazão é um parâmetro fundamental no desenvolvimento de métodos para cromatografia a líquido e o equipamento de CE não trabalha com esse parâmetro, mas apenas com a pressão que é aplicada.

Dessa forma, foram estudados 5 níveis de pressão entre 2 e 6 bar, de acordo com o permitido pelo equipamento de CE. Pressões menores do que 2 bar não foram utilizadas por não serem aplicáveis pelo equipamento na disposição adotada (injeções pelo lado mais curto até o detector). Pressões maiores do que 6 bar não foram utilizadas por serem passíveis de provocar danos à coluna monolítica.

Um reservatório completamente preenchido por fase móvel (70% v/v de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  10,0 mmol  $\text{L}^{-1}$  e 30% v/v de ACN) foi alocado na posição de injeção (*inlet*) do equipamento enquanto outro reservatório completamente vazio e previamente pesado foi alocado na posição de saída (*outlet*). Tiourea 2 mmol  $\text{L}^{-1}$  foi utilizada como marcador de fluxo e injetada na coluna a 50 mbar por 10 s. Foi aplicada pressão sobre o reservatório *inlet* e, a cada 10 minutos, o reservatório *outlet* foi pesado para medir a massa de fase móvel transportada após passar pelo capilar contendo 8,0 cm de coluna monolítica (36,0 cm de comprimento total do capilar). Quando se utiliza o nível de 2 bar de pressão, a massa transportada em 10 minutos é muito pequena. Assim, o intervalo de pesagem foi a cada 30 minutos.

Para cada nível de pressão foram realizadas 5 pesagens. O experimento foi realizado em triplicata, sendo cada réplica realizada com uma coluna distinta. Um gráfico contendo as curvas de massa em função do tempo está apresentado na Figura 23, com cada curva sendo a regressão linear entre triplicatas autênticas.

Figura 23 – Curvas de massa de fase móvel em função do tempo de corrida para os diferentes níveis de pressão



Níveis de pressão: 2 bar (x), 3 bar (●), 4 bar (◆), 5 bar (▲) e 6 bar (■). Obs.: regressão linear de triplicatas autênticas.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Utilizando a densidade da fase móvel ( $0,95202 \text{ g mL}^{-1}$ ) e o coeficiente angular das curvas obtidas, foi possível calcular a vazão em  $\mu\text{L min}^{-1}$ . A densidade da fase móvel foi calculada após a medição de sua massa em 5 níveis de volume entre 0,01 e 1 mL, com 10 medições em cada nível, à temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . A Tabela 3 mostra os valores de vazão encontrados.

Tabela 3 – Valores médios de vazão de fase móvel e desvio padrão para diferentes níveis de pressão

| Pressão (bar) | Vazão <sup>a</sup> ( $\mu\text{L min}^{-1}$ ) | Vazão <sup>b</sup> ( $\mu\text{L min}^{-1}$ ) |
|---------------|---|---|
| 2             | $0,83 \pm 0,01$                               | $0,88 \pm 0,03$                               |
| 3             | $1,10 \pm 0,02$                               | $1,29 \pm 0,04$                               |
| 4             | $1,61 \pm 0,05$                               | $1,73 \pm 0,03$                               |
| 5             | $1,91 \pm 0,05$                               | $2,04 \pm 0,05$                               |
| 6             | $2,26 \pm 0,08$                               | $2,36 \pm 0,03$                               |

a: vazão medida a partir da massa  $\pm$  desvio padrão; b: vazão medida a partir do tempo de retenção da tioureia  $\pm$  desvio padrão

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Quando se calcula a vazão ( $v$ ) utilizando a velocidade de migração da tioureia obtida a partir do seu tempo de retenção (Equação 3), obtemos valores

ligeiramente maiores do que os encontrados utilizando a massa de fase móvel (Tabela 3). Isso pode ser explicado por erros experimentais durante a medição da massa ou pelo fato de que para o cálculo levando em consideração o tempo de retenção considerou-se o volume do capilar sem a presença de fase estacionária.

Equação 3 – Vazão em função do tempo de retenção da tioureia

$$v = \frac{\pi \times r_{ic}^2 \times L_t}{t_R}$$

onde  $r_{ic}$  é o raio interno do capilar (50  $\mu\text{m}$ ),  $L_t$  é o comprimento total da coluna (8,5 cm) e  $t_R$  é o tempo de retenção da tioureia.

Outra constatação importante é a reprodutibilidade das colunas no que diz respeito à vazão de fase móvel. O tempo de retenção da tioureia para cada pressão estudada em três colunas diferentes não teve variação significativa (Tabela 4). Os desvios padrões relativos (RSD) da vazão de fase móvel foram todos menores do que 5%, ou seja, o parâmetro pressão é robusto e a vazão não varia significativamente entre colunas diferentes.

Tabela 4 – Tempo de retenção da tioureia para diferentes níveis de pressão e desvio padrão relativo da vazão de fase móvel

| Pressão (bar) | $t_{R1}$<br>(min) | $t_{R2}$<br>(min) | $t_{R3}$<br>(min) | Vazão Média <sup>a</sup><br>( $\mu\text{L min}^{-1}$ ) | RSD <sup>b</sup> (%) |
|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|--|----------------------|
| 2             | 0,736             | 0,767             | 0,783             | 0,88   | 3,2                  |
| 3             | 0,501             | 0,524             | 0,527             | 1,29   | 2,8                  |
| 4             | 0,387             | 0,391             | 0,380             | 1,73   | 1,4                  |
| 5             | 0,322             | 0,323             | 0,337             | 2,04   | 2,5                  |
| 6             | 0,286             | 0,280             | 0,283             | 2,36   | 1,1                  |

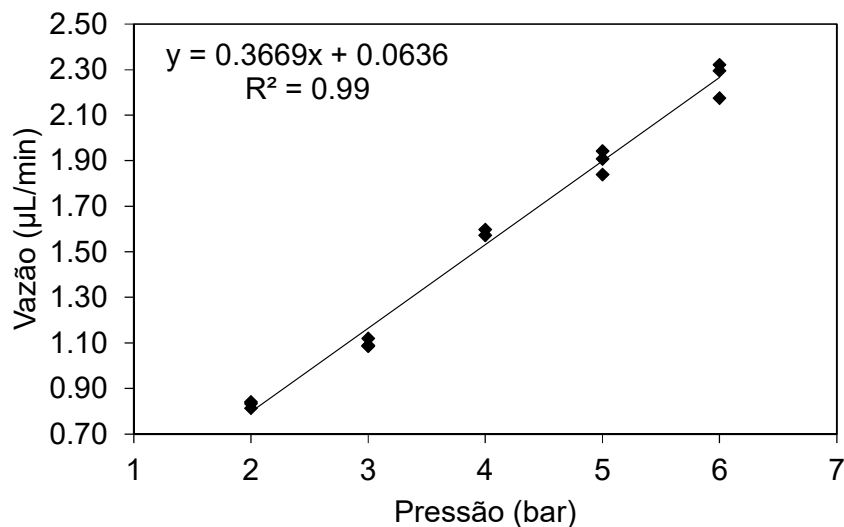
Obs.: tempos de retenção em triplicata; a: vazão a partir do tempo de retenção da tioureia; b: desvio padrão relativo

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

É possível perceber pela Figura 24 a relação de linearidade entre a pressão aplicada e a vazão de fase móvel, mostrando que a aplicação de

pressão pode ser utilizada sem problemas como parâmetro de um método para CLC utilizando o equipamento de CE. A curva foi submetida a análise de variância e não apresentou falta de ajuste em um intervalo de 95% de confiança, conforme o valor de F calculado (3,45) foi menor que o de F tabelado (3,86).

Figura 24 – Curva de vazão de fase móvel em função da pressão aplicada

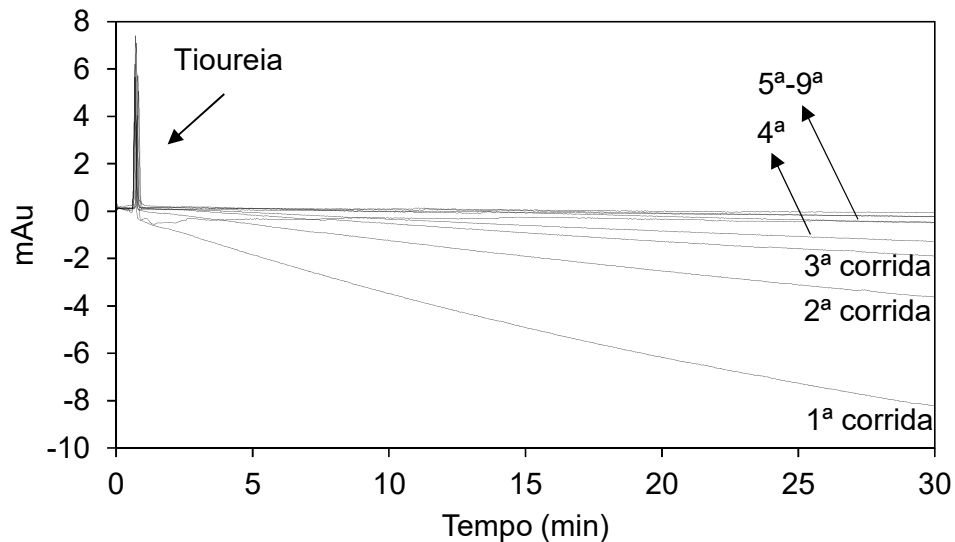


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Essa linearidade é importante para mostrar que os métodos desenvolvidos aqui poderão ser aplicados em um equipamento dedicado à LC, como um nano-LC, por exemplo, bastando aplicar a vazão correspondente à pressão. Nesse caso, cabe ressaltar que a faixa de vazão reportada na literatura para um sistema de nano-LC está entre 0,01 e 1 µL min<sup>-1</sup> e para CLC entre 1 e 10 µL min<sup>-1</sup>, embora exista no mercado equipamentos que trabalham entre 0,01 e 5 µL min<sup>-1</sup>, como o *Prominence nano* (Shimadzu Corporation), que atende a faixa obtida neste trabalho: 0,83 a 2,26 µL min<sup>-1</sup>.

Na Figura 25 estão sobrepostos em um mesmo gráfico os cromatogramas obtidos após 9 corridas consecutivas aplicando-se pressão de 2 bar. Nota-se que o pico da tiourea não sofre variação significativa do tempo de retenção.

Figura 25 – Cromatogramas das primeiras 9 corridas de uma coluna monolítica nova



Corridas sob pressão de 2 bar com injeção de tioureia  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  a  $50 \text{ mbar} \times 10 \text{ s}$ ;  
 detecção a  $220 \text{ nm}$ ; temperatura a  $25^\circ\text{C}$

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Ainda pelos cromatogramas da Figura 25, que foram obtidos a partir de uma coluna nova, observa-se que são necessários pelo menos 150 minutos para estabilização da coluna. Entende-se como coluna nova aquela que ainda não havia sido utilizada no equipamento e não passou por processo de condicionamento, apenas a limpeza inicial com metanol logo após o processo de polimerização. Somente a partir da quinta corrida a linha base se estabiliza, ou seja, após 150 minutos de corrida considerando-se a soma dos tempos das corridas anteriores. Uma provável causa para isso pode ser a presença de resíduos da polimerização que não foram completamente removidos com a limpeza com metanol.

Uma forma de ilustrar isso foi com o preparo do polímero em escala maior, usando seringas em substituição aos capilares. O polímero foi lavado com 40 mL de metanol e os primeiros 20 mL de resíduo apresentaram-se como uma solução turva e os 20 mL finais como uma solução límpida e translúcida (Figura 26). Isso mostra a importância de realizar a limpeza da coluna monolítica após a

polimerização e monitorar o processo de condicionamento da mesma antes de iniciar as análises por CEC ou CLC.

Figura 26 – Fotografia mostrando os polímeros preparados em seringas e os resíduos após limpeza com metanol



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

#### 4.3 ANÁLISE QUALITATIVA DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO CAPILAR

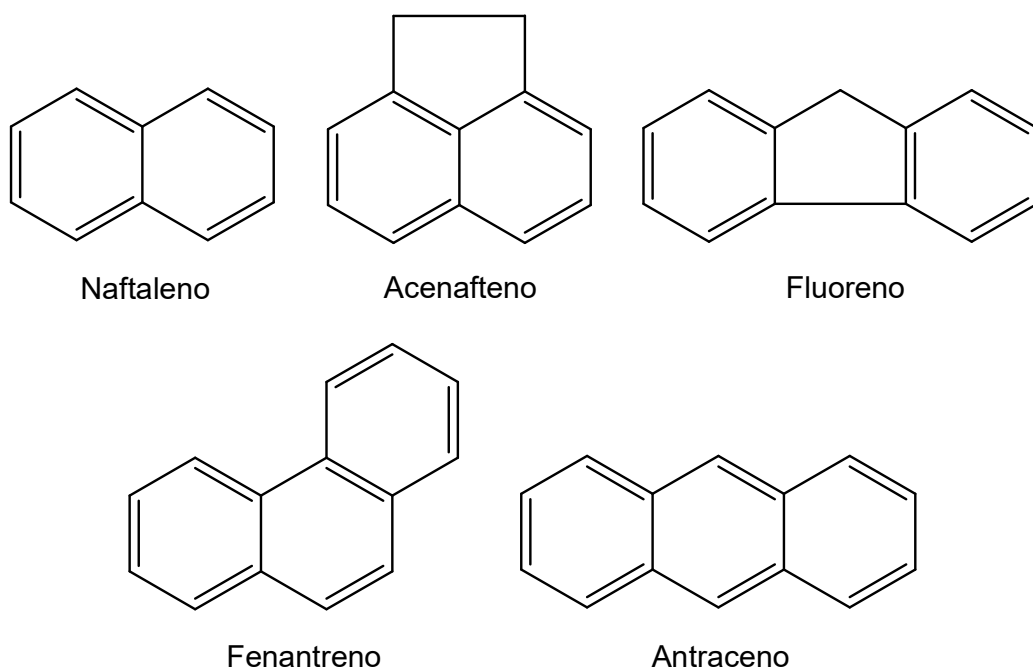
Demonstrada a aplicabilidade do parâmetro pressão como forma de bombeamento da fase móvel, o próximo passo foi o estudo da viabilidade da coluna monolítica ser utilizada como uma coluna de separação em CLC. Para isso, foi considerado como ponto de partida, o método de CEC desenvolvido para a coluna monolítica baseada no MPTMS na separação de uma mistura de cinco hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (VAZ *et al.*, 2012).

Os HPAs são compostos neutros e apolares constituídos apenas por carbono e hidrogênio, caracterizando-se por terem em sua estrutura dois ou mais anéis aromáticos condensados. Por se tratarem de moléculas neutras e apolares, têm sido utilizados na avaliação de fases estacionárias monolíticas em CEC. (DING *et al.*, 1997; GARGUILO *et al.*, 2000; DABEK-ZLOTORZYNSKA *et al.*, 2008; BERNABÉ-ZAFÓN *et al.*, 2010; OU *et al.*, 2010).

Além disso, são um importante grupo de analitos de interesse ambiental, sendo que a USEPA (*United States Environmental Protection Agency*) estabeleceu uma lista de dezesseis HPAs considerados prioritários para

monitoramento ambiental, em função de sua carcinogenicidade e ocorrência. Dentre eles podemos citar o naftaleno, acenafteno, fluoreno, antraceno e fenantreno (Figura 27).

Figura 27 – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos utilizados como mistura teste



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Uma mistura constituída pelos HPAs da Figura 27 pode ser utilizada na avaliação da capacidade da coluna monolítica em separar moléculas neutras apolares. Para a análise dos HPAs por LC, utilizando uma fase móvel constituída apenas por água e ACN, foi proposto um planejamento fatorial  $3^2$  variando em três níveis a porcentagem de ACN e a pressão de bombeamento da fase móvel, como descrito na Tabela 5.



Tabela 5 – Planejamento fatorial  $3^2$  variando em três níveis a porcentagem de ACN e a pressão de bombeamento da fase móvel

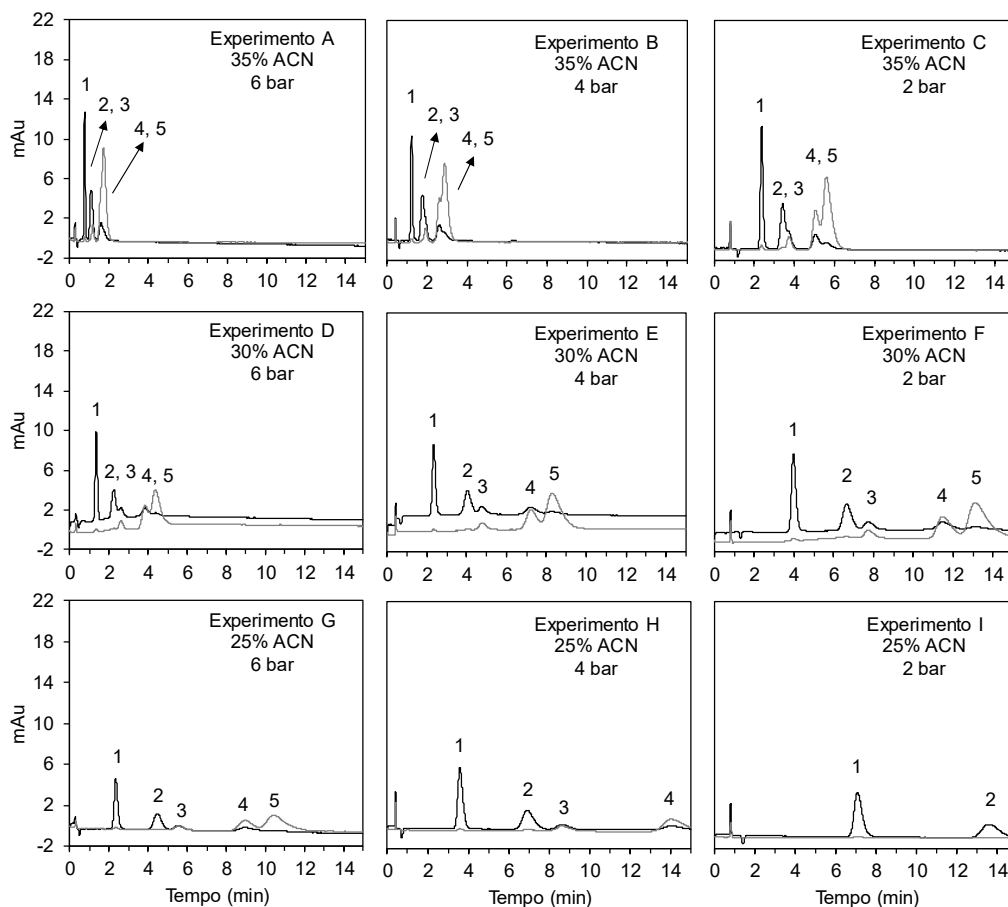
| <b>Experimento</b> | <b>ACN (%)</b> | <b>Pressão (bar)</b> |
|--------------------|----------------|----------------------|
| 1                  | 35 (+)         | 6 (+)                |
| 2                  | 35 (+)         | 4 (0)                |
| 3                  | 35 (+)         | 2 (-)                |
| 4                  | 30 (0)         | 6 (+)                |
| 5                  | 30 (0)         | 4 (0)                |
| 6                  | 30 (0)         | 2 (-)                |
| 7                  | 25 (-)         | 6 (+)                |
| 8                  | 25 (-)         | 4 (0)                |
| 9                  | 25 (-)         | 2 (-)                |

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Os demais parâmetros foram mantidos constantes e estão descritos na legenda da Figura 28. Antes do primeiro uso, a coluna foi condicionada até estabilização da linha base com uma mistura de 50% v/v de água e ACN. Entre as corridas o condicionamento foi feito com 3 minutos de MeOH e 3 minutos de fase móvel. O condicionamento foi feito através da aplicação de pressão (5 bar) no reservatório de entrada. Todos os HPAs foram solubilizados em metanol.

Pelos cromatogramas da Figura 28 pode-se notar que o pico referente ao naftaleno aparece completamente separado dos demais em todos os casos do planejamento. Existem dois pares de picos cuja separação demonstrou ser crítica dentro de cada par. Os pares acenafteno/fluoreno e antraceno/fenantreno parecem estar praticamente resolvidos nos experimentos E, F e G, mas nos experimentos A, B, C e D os picos estão coeluídos. Nos experimentos H e I, o tempo de corrida de 15 minutos não foi suficiente para que todos os picos aparecessem.

Figura 28 – Cromatogramas das análises de HPAs no planejamento fatorial 3<sup>2</sup> para uma coluna de 8,0 cm



Condições de corrida: injeção de mistura de HPAs 2 mmol L<sup>-1</sup> e tiourea 2 mmol L<sup>-1</sup> a 50 mbar x 10 s; temperatura a 25 °C; detecção a 220 nm (linha preta) e a 250 nm (linha cinza). Picos: 1) naftaleno, 2) Acenafteno, 3) Fluoreno, 4) Fenantreno e 5) Antraceno

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Quando os experimentos E, F e G são comparados em termos de resolução ( $R_s$ ) entre os pares de picos (Tabela 6), o experimento E apresentou os melhores resultados em relação aos pares críticos, com valores de resolução maiores que nos demais experimentos. A resolução pode ser calculada conforme a Equação 4 – Resolução entre dois pares de picos Equação 4.

Tabela 6 – Valores de resolução para os pares de picos dos HPAs em coluna de 8,0 cm

| Ensaio         | $R_{S(1,2)}$ | $R_{S(2,3)}$ | $R_{S(3,4)}$ | $R_{S(4,5)}$ |
|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| E <sup>a</sup> | 1,82         | 0,86         | 1,63         | 0,84         |
| F <sup>a</sup> | 2,56         | 0,91         | 2,56         | 0,83         |
| G <sup>a</sup> | 2,27         | 0,99         | 2,51         | 0,91         |
| E <sup>b</sup> | 2,99         | 2,07         | 1,70         | 1,49         |
| F <sup>b</sup> | 3,04         | 0,93         | 2,63         | 0,78         |
| G <sup>b</sup> | 2,93         | 1,04         | 2,62         | 0,78         |

Obs.: a: 220 nm; b: 250 nm;  $R_{S(i,j)}$  é a resolução entre os picos  $i$  e  $j$ , sendo que  $i$  é o pico do analito menos retido e  $j$  o pico do analito mais retido; picos: 1 - naftaleno; 2 - acenafteno; 3 - fluoreno; 4 - fenantreno; 5 - antraceno

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Equação 4 – Resolução entre dois pares de picos

$$R_{S(i,j)} = 2 \times \left( \frac{t_{R(j)} - t_{R(i)}}{W_j + W_i} \right)$$

onde  $R_{S(i,j)}$  é a resolução entre os picos  $i$  e  $j$ , sendo que  $i$  é o pico do analito menos retido e  $j$  o pico do analito mais retido;  $t_R$  é o tempo de retenção de cada pico e  $W$  é a largura de cada pico.

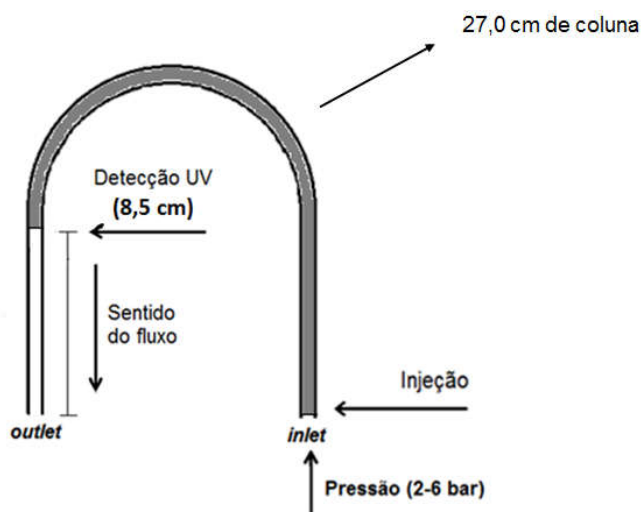
O acenafteno difere do fluoreno apenas pela posição em que os anéis estão condensados, mas esse fato já é suficiente para que entre eles haja uma separação através da coluna. O mesmo acontece entre o antraceno e o fenantreno. Esses dois últimos, ambos com cadeia carbônica de três anéis benzênicos, correspondem aos analitos mais apolares.

A ordem de eluição, comprovada pela análise de solução padrão individual de cada HPA (não mostrada), sugere um comportamento do sistema típico de fase reversa em que os analitos com característica mais apolar eluem por último, pois interagem mais com a fase estacionária. Essa possui características apolares, como foi observado em um experimento em que uma fração do polímero foi mergulhada em um béquer contendo água. O polímero claramente não interagiu com a água e foi repelido por essa, sendo impossível sua submersão até que uma certa fração de ACN fosse adicionada. Uma breve

discussão sobre uma provável estrutura química para o polímero será apresentada na seção 4.6.

Como forma de tentar melhorar a resolução dos pares críticos de picos citados anteriormente, foi realizado uma outra série de experimentos com o mesmo planejamento fatorial  $3^2$  utilizado anteriormente (Tabela 5), mas com uma coluna monolítica maior (27,0 cm). Para isso o posicionamento dos reservatórios *inlet* e *outlet* devem ser invertidos no equipamento, pois a distância até o detector é fixa, e neste caso deve estar a 27,5 cm a partir da extremidade de entrada do capilar (Figura 29).

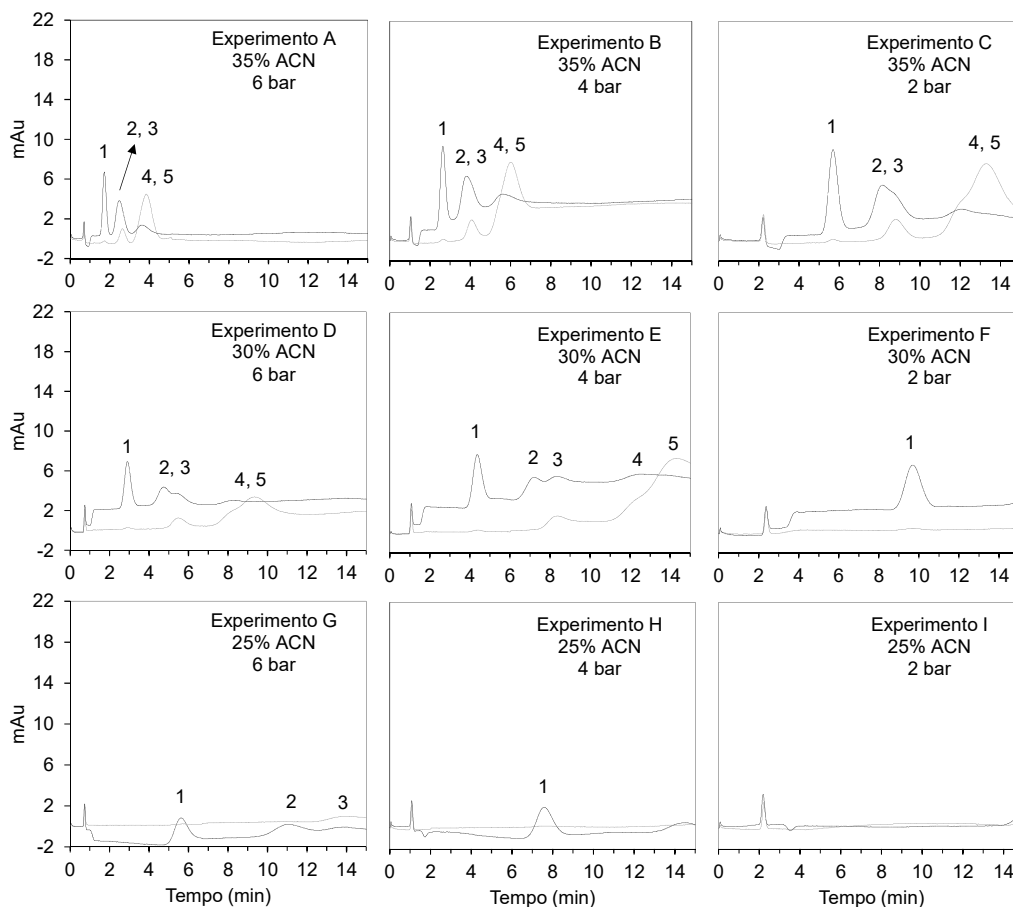
Figura 29 – Esquema mostrando um capilar com 27,0 cm de coluna monolítica no equipamento de CE



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Em uma coluna maior espera-se que os analitos tenham mais tempo para interagir com a fase estacionária e possam ser separados dos demais. Porém, conforme indicam os cromatogramas da Figura 30, não houve melhoras na resolução dos picos, pelo contrário, os resultados parecem ser piores do que os obtidos com uma coluna de 8,0 cm. Em cromatografia a líquido, colunas muito longas podem ocasionar alta queda de pressão, redução da vazão da fase móvel e perda de eficiência de separação devido ao alargamento dos picos (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

Figura 30 – Cromatogramas das análises de HPAs no planejamento fatorial  $3^2$  para uma coluna de 27,0 cm



Condições de corrida: injeção de mistura de HPAs  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  e tiourea  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  a 50 mbar x 10 s; temperatura a  $25^\circ\text{C}$ ; detecção a 220 nm (linha preta) e a 250 nm (linha cinza). Picos: 1) naftaleno, 2) Acenafteño, 3) Fluoreno, 4) Fenantreno e 5) Antraceno.

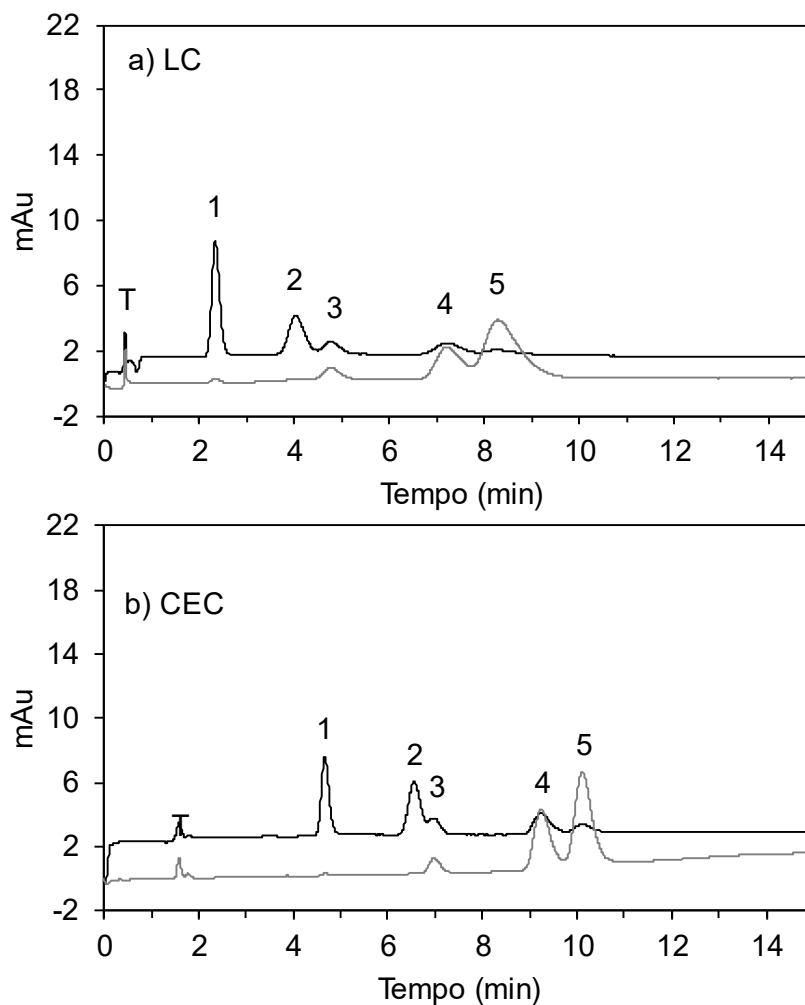
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

#### 4.3.1 Comparação entre CLC e CEC na análise de HPAs

Ainda dentro da análise de HPAs, é interessante ressaltar que os resultados por CLC foram semelhantes aos obtidos por CEC utilizando o método otimizado por Vaz *et al.* (2012) mostrando que a coluna pode ser usada para ambas as técnicas. O perfil de separação dos analitos em uma coluna de 8,0 cm foi semelhante entre uma análise por CLC com fase móvel aquosa contendo

30% ACN e vazão sob 4 bar de pressão e uma análise por CEC com fase móvel aquosa contendo 40% ACN e acetato de amônio, sob voltagem de -20 kV (Figura 31).

Figura 31 – Cromatograma e eletrocromatograma da análise de HPAs para uma coluna de 8,0 cm



Condições de corrida na análise de uma mistura de HPAs  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  a) LC: injeção a 50 mbar x 10 s; fase móvel 30% ACN; vazão sob 4 bar de pressão; temperatura a  $25^\circ\text{C}$  e b) CEC: injeção a -25 mbar x 5 s; fase móvel:  $\text{NH}_4\text{Ac } 16,7 \text{ mmol L}^{-1}$  (60%) e ACN (40%); voltagem: -20 kV; temperatura a  $20^\circ\text{C}$ . Detecção a 220 nm (linha preta) e 250 nm (linha cinza). Picos: 1) naftaleno, 2) Acenafteno, 3) Fluoreno, 4) Fenantreno, 5) Antraceno e T) Tiourea

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Entretanto, sob essas condições de análise, o tempo de eluição dos analitos na análise por CLC foi menor do que na análise por CEC. Isso ocorre pela diferença entre as vazões obtidas pelo modo eletrocinético e pelo modo hidrodinâmico. O bombeamento da fase móvel por CEC se dá através do fluxo eletrosmótico enquanto que por CLC o bombeamento é através da aplicação de pressão. Enquanto a vazão mínima obtida nos estudos envolvendo CLC (aplicando-se 2 bar) foi de 0,88  $\mu\text{L min}^{-1}$ , a vazão em CEC foi de 0,40  $\mu\text{L min}^{-1}$ , baseado no tempo de migração da tiourea e calculados conforme Equação 3.

A Tabela 7 mostra a eficiência de separação baseada no número de pratos (N) por metro de coluna que pode ser calculada conforme a Equação 5.

Tabela 7 – Número de pratos em CEC e CLC na análise de HPAs

| <b>Analito</b> | <b>N (CEC)</b> | <b>N (CLC)</b> |
|----------------|----------------|----------------|
| Naftaleno      | 38740          | 10285          |
| Acenafteno     | 31548          | 10119          |
| Fluoreno       | 23724          | 8649           |
| Fenantreno     | 38871          | 13899          |
| Antraceno      | 43992          | 7621           |

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Equação 5 – Número de pratos por metro da coluna

$$N = \frac{5,54 \times \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2}{L_t}$$

onde  $t_R$  é o tempo de retenção do analito;  $W_{1/2}$  é a largura do pico a meia altura; e  $L_t$  é o comprimento total da coluna, no caso, 0,08 m. Para todos os analitos, a eficiência de separação por CEC foi maior do que por CLC. Esse resultado é coerente, uma vez que o fluxo do líquido no interior da coluna em CEC é consequência da eletrosmose e tem um perfil plano através do capilar, pois origina-se em suas paredes. Consequentemente, o fluxo eletrosmótico não contribui para o alargamento de banda. Em contrapartida, o fluxo gerado por bombeamento através de pressão em CLC tem perfil parabólico (SKOOG, 2005).

### 4.3.2 Modificação da coluna monolítica com benzil metacrilato

Obviamente a coluna monolítica baseada apenas no monômero MPTMS possui diversas limitações relacionadas à sua polaridade e seletividade. Adicionar grupos mais apolares em sua estrutura pode ser uma estratégia para melhorar a separação de alguns HPAs. Dessa forma, um monômero contendo um grupo benzila foi adicionado à mistura polimérica como tentativa de reduzir a polaridade da coluna monolítica e aumentar a interação entre os HPAs e a fase estacionária.

O monômero escolhido foi o benzil metacrilato, que possui um grupo metacrilato que pode ser polimerizado via adição radicalar ao grupo metacrilato do MPTMS. O grupo benzila pode interagir com os HPAs através de interações do tipo  $\pi$ - $\pi$ , o que poderia aumentar a seletividade no caso de uma análise contendo outras substâncias além dos HPAs.

O cromatograma da Figura 32 mostra a separação dos HPAs por uma coluna modificada com benzil metacrilato. Não houve alteração no perfil de separação dos analitos com relação à coluna sem modificação, apresentando valores semelhantes de resolução (Tabela 1Tabela 8).

Tabela 8 – Valores de resolução para os pares de picos dos HPAs em coluna modificada e não modificada

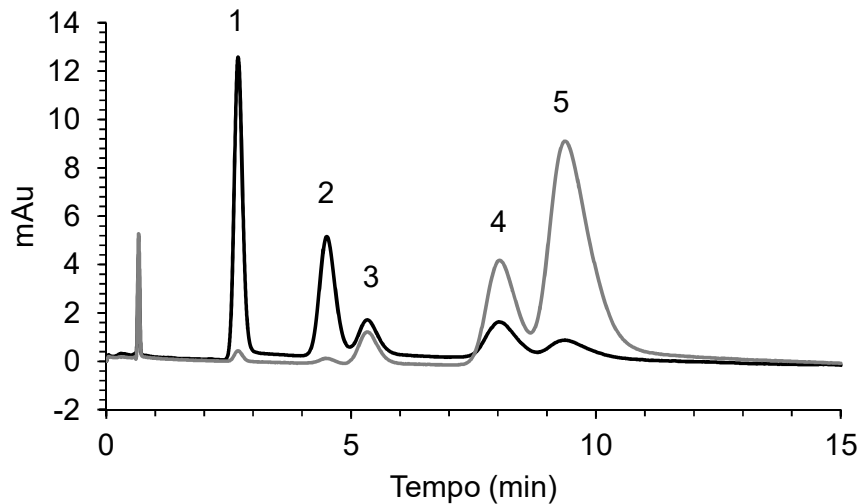
| Coluna                      | $R_{s(1,2)}$ | $R_{s(2,3)}$ | $R_{s(3,4)}$ | $R_{s(4,5)}$ |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Não modificada <sup>a</sup> | 1,82         | 0,86         | 1,63         | 0,84         |
| Não modificada <sup>b</sup> | 2,99         | 2,07         | 1,70         | 1,49         |
| Modificada <sup>a</sup>     | 2,21         | 0,82         | 1,98         | 0,72         |
| Modificada <sup>b</sup>     | 2,61         | 0,74         | 1,89         | 0,70         |

Obs.: a: detecção a 220 nm e b: detecção a 250 nm

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR



Figura 32 – Cromatograma da análise de HPAs com uma coluna monolítica modificada com benzil metacrilato



Condições de corrida na injeção de HPAs  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  a  $50 \text{ mbar} \times 10 \text{ s}$ ; fase móvel 30% ACN; vazão sob 4 bar de pressão; temperatura a  $25^\circ\text{C}$ ; detecção a 220 nm (linha preta e a 250 nm (linha cinza)

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A eficiência de separação também não apresentou grandes variações quando comparada com os resultados da coluna sem modificação. Porém, a área de todos os picos na coluna modificada foi maior. Na Tabela 9 são mostrados o número de pratos e a área de cada pico. Valores mais elevados de área podem levar a uma melhor sensibilidade analítica, o que torna promissora a continuação dos estudos envolvendo a modificação da coluna com benzil metacrilato.

Tabela 9 – Valores de número de pratos e área de pico em coluna modificada e não modificada

| <b>Analito</b> | <b>N<sup>a</sup></b> | <b>N<sup>b</sup></b> | <b>Área do pico<sup>a</sup></b> | <b>Área do pico<sup>b</sup></b> |
|----------------|----------------------|----------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Naftaleno      | 10285                | 11077                | 82                              | 152                             |
| Acenafteno     | 10119                | 10980                | 45                              | 106                             |
| Fluoreno       | 8649                 | 9647                 | 16                              | 37                              |
| Fenantreno     | 13899                | 10158                | 40                              | 140                             |
| Antraceno      | 7621                 | 6903                 | 126                             | 450                             |

Obs.: a: coluna sem modificação e b: coluna modificada com benzyl metacrilato;  
valores de área em unidades arbitrárias

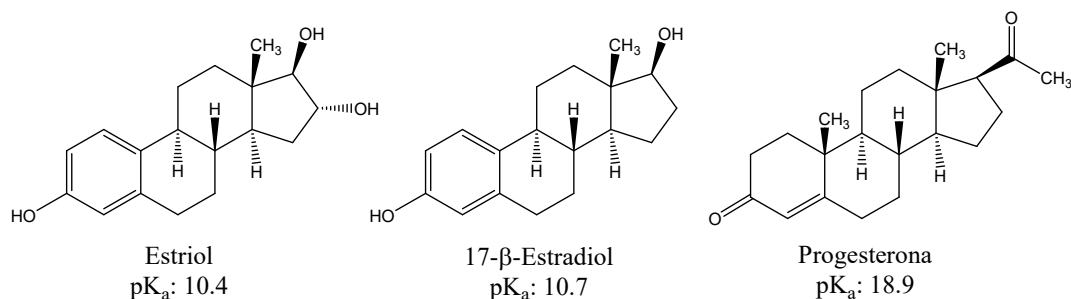
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

#### 4.4 ANÁLISE QUALITATIVA DE ESTRIOL, 17- $\beta$ -ESTRADIOL E PROGESTERONA POR CROMATOGRÁFIA A LÍQUIDO CAPILAR

Outro grupo de substâncias de interesse para serem analisadas com utilização da coluna monolítica são os esteroides. Esse grupo de substâncias possui um centro estrutural formado pelo ciclopenta[a]perhidrofenantreno e desempenham um importante papel na fisiologia humana. Alguns deles atuam como hormônios sexuais, dentro os quais podemos citar o estriol, o 17- $\beta$ -estradiol e a progesterona (Figura 33), responsáveis pelos caracteres sexuais e por dar suporte à reprodução (ARCAND-HOY; NIMROD; BENSON, 1998; COOMBS; BHATT, 1987; RUGGIERO, 2002).

Várias formulações farmacêuticas têm sido desenvolvidas para reposição hormonal em mulheres após a menopausa, por exemplo, na prevenção de osteoporose e minimizando os sintomas vasomotores e a atrofia vaginal. Esses esteroides podem ser usados isolados ou em combinação de dois ou mais em uma formulação. A associação entre estrogênios (como o estriol ou 17- $\beta$ -estradiol) e progestogênios (como a progesterona) tem sido recomendada para mulheres que passaram pela menopausa, pois o progestogênio limita a hiperplasia do endométrio acentuada pelo uso de estrogênios. Em outros casos, o uso isolado de estrogênios é recomendado (GIACOMINI; APARECIDA; MELLA, 2006; POLONINI *et al.*, 2014; POLONINI; RAPOSO; BRANDÃO, 2011).

Figura 33 – Estrutura do estriol, 17- $\beta$ -estradiol e progesterona e seus respectivos valores de  $pK_a$ .



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A análise de esteroides em diferentes matrizes tem sido possível através de técnicas de separação analítica tais como HPLC (BOCIAN; SOUKUP; MATYSKA, 2012; POLONINI *et al.*, 2014), CZE (BRITZ-MCKIBBIN *et al.*, 2003), MEKC (FLOR *et al.*, 2010) e CEC (JIN *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2010). Do ponto de vista da química verde que visa reduzir o impacto ambiental e o econômico (DE LA GUARDIA; GARRIGUES, 2012), são indesejáveis o elevado consumo de solventes, os sistemas complexos de eletrólitos, adição de surfactantes, etapas de derivatização dos analitos e elevado tempo de análise.

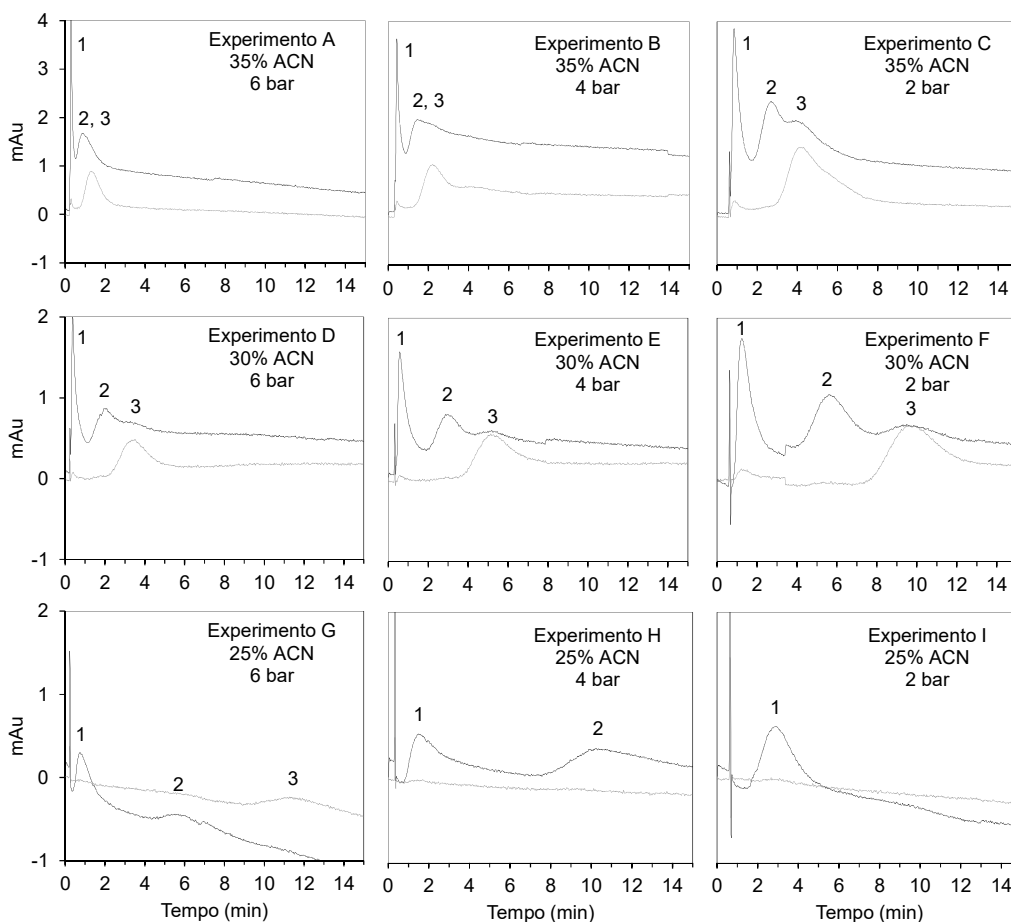
Foi proposto um planejamento fatorial para verificar a possibilidade da análise simultânea de estriol, 17- $\beta$ -estradiol e progesterona por CLC usando a coluna monolítica de MPTMS. Como ponto de partida, o planejamento foi o mesmo utilizado para a análise de HPAs (Tabela 5).

Pelos cromatogramas da Figura 34 notamos que nas condições com 25% de ACN, os três picos estão completamente separados entre si, porém o tempo de análise para as pressões de 4 e 2 bar é desfavorável e causa sério alargamento dos picos, o que pode comprometer a eficiência de separação. Levando em consideração que os esteroides possuem um caráter apolar, o aumento da fração aquosa na fase móvel faz com que os analitos interajam por mais tempo com a fase estacionária de característica apolar, retardando a migração. Para as análises com 35% de ACN claramente os três picos coeluem entre si.

Quando a proporção de ACN é de 30%, a condição F do planejamento com 2 bar de pressão é a que consegue a melhor separação entre os picos dos

três analitos. A ordem de eluição, comprovada pela análise de solução padrão individual de cada esteroide (não mostrada), aponta para a natureza apolar da fase estacionária e para a atuação do sistema como fase reversa, em que o analito mais apolar, a progesterona, elui por último. No caso dos outros dois analitos, a presença de um grupo OH a mais faz com que o estriol seja o mais hidrofílico e elua primeiro por interagir mais com a fase móvel aquosa.

Figura 34 – Cromatogramas das análises de esteroides no planejamento fatorial  $3^2$  para uma coluna de 8,0 cm



Condições de corrida: injeção de mistura de esteroides  $1,67 \text{ mmol L}^{-1}$  a  $70 \text{ mbar} \times 10 \text{ s}$ ; temperatura a  $25^\circ\text{C}$ ; detecção a  $214 \text{ nm}$  (linha preta) e a  $254 \text{ nm}$  (linha cinza).

Picos: 1) estriol, 2)  $17\text{-}\beta\text{-estradiol}$  e 3) progesterona

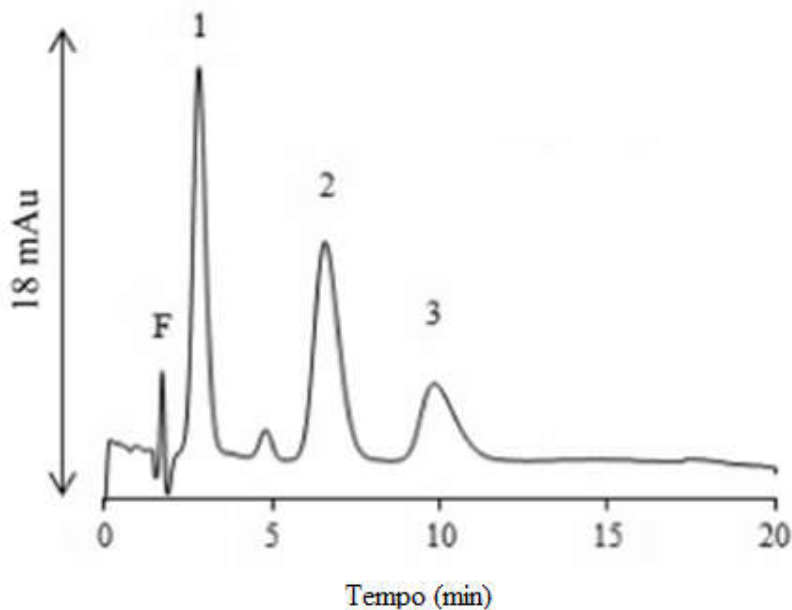
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Esse resultado é coerente com os resultados de outro trabalho em que um planejamento fatorial foi utilizado para otimizar a análise simultânea dos três

esteroides por CEC (MARQUES et al., 2015). Aqui, pode-se confirmar que a separação dos esteroides nas análises por CEC não ocorre por diferenças de eletromigração quando se aplica voltagem, mas apenas pelas diferenças de interação com a fase estacionária. Isso já era esperado tendo em vista que no pH da fase móvel em CEC (pH 7,0), os esteroides encontram-se não ionizados devido aos valores de pKa 10,4, 10,7 e 18,9 para estriol, 17- $\beta$ -estradiol e progesterona, respectivamente (HUWITZ; LIU, 1977).

Todavia, os resultados obtidos por CEC no trabalho desenvolvido anteriormente se mostraram melhores, com os picos mais estreitos e boa resolução (Figura 35).

Figura 35 – Eletrocromatograma de uma análise de esteroides por CEC em uma coluna monolítica de 8,0 cm



Condições de corrida: temperatura a 20°C; injeção a -25 mbar por 15 s; detecção a 214 nm Picos: 1) estriol 4,03 mmol L<sup>-1</sup>; 2) estradiol 4,33 mmol L<sup>-1</sup>; e 3) progesterona 5,07 mmol L<sup>-1</sup> em metanol

Fonte: ADAPTADA DE MARQUES et al., 2015

#### 4.5 ANÁLISE QUANTITATIVA DE ESTRIOL E 17- $\beta$ -ESTRADIOL EM AMOSTRA DE EMULSÃO TRANSDÉRMICA POR ELETROCROMATOLOGRAFIA CAPILAR

A coluna monolítica baseada no monômero MPTMS foi aplicada na análise de uma amostra de emulsão transdérmica. Para análise de uma formulação farmacêutica, como uma emulsão transdérmica contendo associação entre estriol e 17- $\beta$ -estradiol é importante que o método seja capaz de separar os ingredientes ativos dos outros constituintes da matriz (excipientes/veículos) que podem permanecer na solução de amostra após o seu preparo (POLONINI *et al.*, 2014).

Neste cenário, buscou-se analisar uma amostra de emulsão transdérmica por um método desenvolvido para CEC com a coluna monolítica baseada no monômero MPTMS (MARQUES *et al.*, 2015). Trata-se de um método de separação em escala capilar que utiliza pouquíssimo solvente, necessita de pequenas quantidades de amostra e fornece a separação do estriol e 17- $\beta$ -estradiol em um tempo de corrida menor do que 10 minutos.

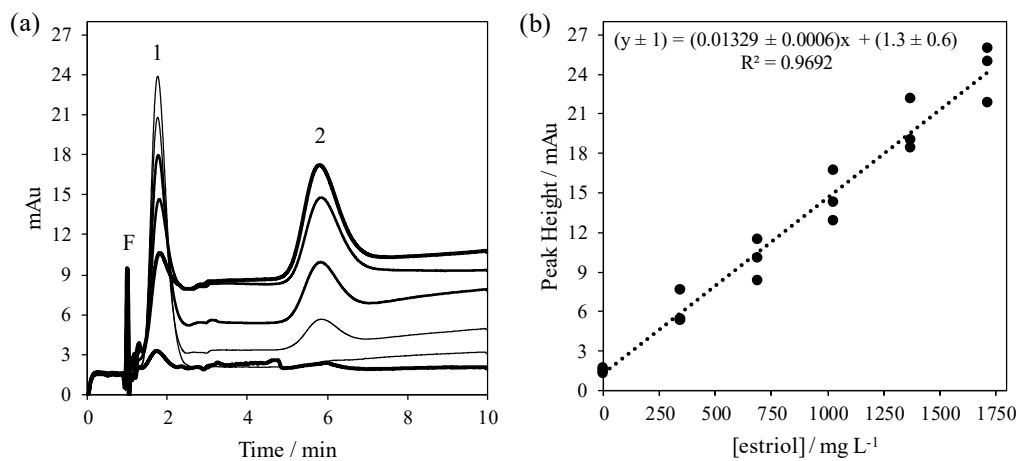
Aproximadamente 1 g de amostras foram pesadas, solubilizadas em metanol e colocadas em banho de ultrassom por 1 hora. O conteúdo do béquer foi transferido para balões volumétricos de 25 mL, que foram completados com metanol para obter a solução de amostra. A solução de amostra foi filtrada em filtros de membrana de 0,45  $\mu$ m antes das análises.

Para eliminar possíveis efeitos de matriz, uma curva de adição de padrão foi construída pela diluição da solução estoque (estriol:11,9 mmol L<sup>-1</sup> e 17- $\beta$ -estradiol:10,4 mmol L<sup>-1</sup>, ambos em metanol) em frascos contendo uma quantidade fixa da solução de amostra até obter as concentrações finais de 0; 1,2; 2,4; 3,6; 4,8 e 5,9 mmol L<sup>-1</sup> de estriol e 5,2; 4,2; 3,1; 2,1; 1,0 e 0 mmol L<sup>-1</sup> de 17- $\beta$ -estradiol, respectivamente. O procedimento adotado foi aumentar a concentração de estriol enquanto se diminuía a concentração de 17- $\beta$ -estradiol.

As soluções de amostras com padrões foram injetadas na coluna monolítica a partir do lado mais próximo ao detector (8,5 cm de comprimento efetivo) com a coluna ocupando os 8,0 cm iniciais. Pressão de 5 bar foi aplicada

no reservatório de entrada para o condicionamento antes da primeira corrida do dia (fluxo de metanol por 5 minutos seguido de fluxo com fase móvel até estabilização da linha base); para o condicionamento entre corridas (fluxo com fase móvel por 5 minutos); e para limpeza após a última corrida do dia (fluxo com metanol por 10 minutos). As demais condições de análise estão descritas na Figura 36 que apresenta a regressão linear dos pontos da curva analítica.

Figura 36 – Resultados da curva de adição de padrão



a) Eletrocromatogramas de uma das réplicas para a curva de adição de padrão. Picos: 1) estriol (amostra + 0, 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 e 5,9 mmol L<sup>-1</sup>); 2) 17-β-estradiol (amostra + 5,2, 4,2, 3,1, 2,1, 1,0 e 0 mmol L<sup>-1</sup>). Condições: NH<sub>4</sub>Ac 10,0 mmol L<sup>-1</sup> (70% v/v) e ACN (30% v/v); voltagem: -20 kV; temperatura: 20°C; injeção: -25 mbar por 15 s; detecção: 214 nm; b) Curva de adição de padrão (triplicatas autênticas)

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A Equação 6 descreve a curva analítica, em triplicatas autênticas, que não apresentou falta de ajuste em um intervalo de 95% de confiança ( $F_{\text{calculado}} = 0,12 < F_{0,05; 4; 12} = 3,26$ ). A curva foi obtida através da regressão linear dos pontos pelo método dos mínimos quadrados (PIMENTEL; NETO, 1996).

Equação 6 – Regressão linear da curva analítica

$$(A_s \pm 1) = (0,01329 \pm 0,00006) \times C_s + (1,3 \pm 0,6)$$

onde  $A_s$  é a área do pico na amostra em unidades arbitrárias e  $C_s$  a concentração da amostra em mg L<sup>-1</sup>. Pode-se encontrar o valor de  $C_s$  quando  $A_s$  é nulo. Assim,

a concentração observada de estriol foi de  $(99,1 \pm 0,5)$  mg L<sup>-1</sup>, quantidade equivalente a  $(5,0 \pm 0,5)$  mg g<sup>-1</sup> na emulsão transdérmica.

Para o estriol, os limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) foram de 7 mg L<sup>-1</sup> e 2 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, calculados pelas equações Equação 7 e Equação 8:

Equação 7 – Limite de quantificação do analito

$$LQ = 10 \times \left( \frac{S_r \times C_p}{H_{max} - H_{min}} \right)$$

Equação 8 – Limite de detecção do analito

$$LD = 3 \times \left( \frac{S_r \times C_p}{H_{max} - H_{min}} \right)$$

onde  $S_r$  é o desvio padrão do ruído da linha base;  $C_p$  é a concentração adicionada de padrão; e  $H_{max} - H_{min}$  é a altura do pico a partir da linha base.

O valor de  $(5,0 \pm 0,5)$  mg g<sup>-1</sup> de estriol encontrado difere do valor apresentado no rótulo do produto (4,0 mg g<sup>-1</sup>). Por outro lado, o pico do 17- $\beta$ -estradiol não foi observado nos eletrocromatogramas das amostras sem padrão, não sendo possível quantificar esse esteroide na emulsão. Entretanto, com a adição de padrão, esse pico aparece separado dos demais, como esperado.

A análise com adição de padrão provou que o método é adequado para analisar amostras reais, com adequada especificidade (coeluição não foi observada). Entretanto, a amostra comercial, a qual se espera que cumpra os critérios de qualidade definidos nas farmacopeias, falhou neste aspecto. Sobre isso, duas hipóteses podem ser consideradas: i) a amostra não atende efetivamente os critérios de qualidade, devido às más práticas de produção ou por adulteração; ou ii) a amostra foi produzida com a quantidade reportada dos ingredientes ativos, mas uma conversão entre os dois esteroides pode ter ocorrido. É sabido que o estradiol pode ser reversivelmente convertido em estrona, e que esta pode ser convertida em estriol (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). O método oficial da *United States Pharmacopeia* é capaz de identificar estes metabolitos, e uma certa quantidade de estrona é tolerável (USP – THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2014).



#### 4.6 ANÁLISE DE NMR NO ESTADO SÓLIDO DO $^{13}\text{C}$ NO POLÍMERO DA COLUNA MONOLÍTICA

A Figura 37 mostra os espectros de NMR no estado sólido do  $^{13}\text{C}$  obtidos na análise dos polímeros de MPTMS. O espectro da Figura 37.a refere-se ao polímero que foi lavado com passagem de 40 mL de metanol pela seringa imediatamente após a polimerização e o espectro da Figura 37.b refere-se ao polímero em que não foi realizada lavagem com metanol. Ambos os polímeros foram deixados a temperatura ambiente até completa evaporação dos solventes antes de serem analisados por NMR.

As atribuições feitas aos deslocamentos químicos são apresentadas na Tabela 10 e foram adotados como referência os trabalhos de Neppel e Butler (1984) e Tavares e Monteiro (2005) que tratam da análise de NMR no estado sólido de polímeros de metil metacrilatos.

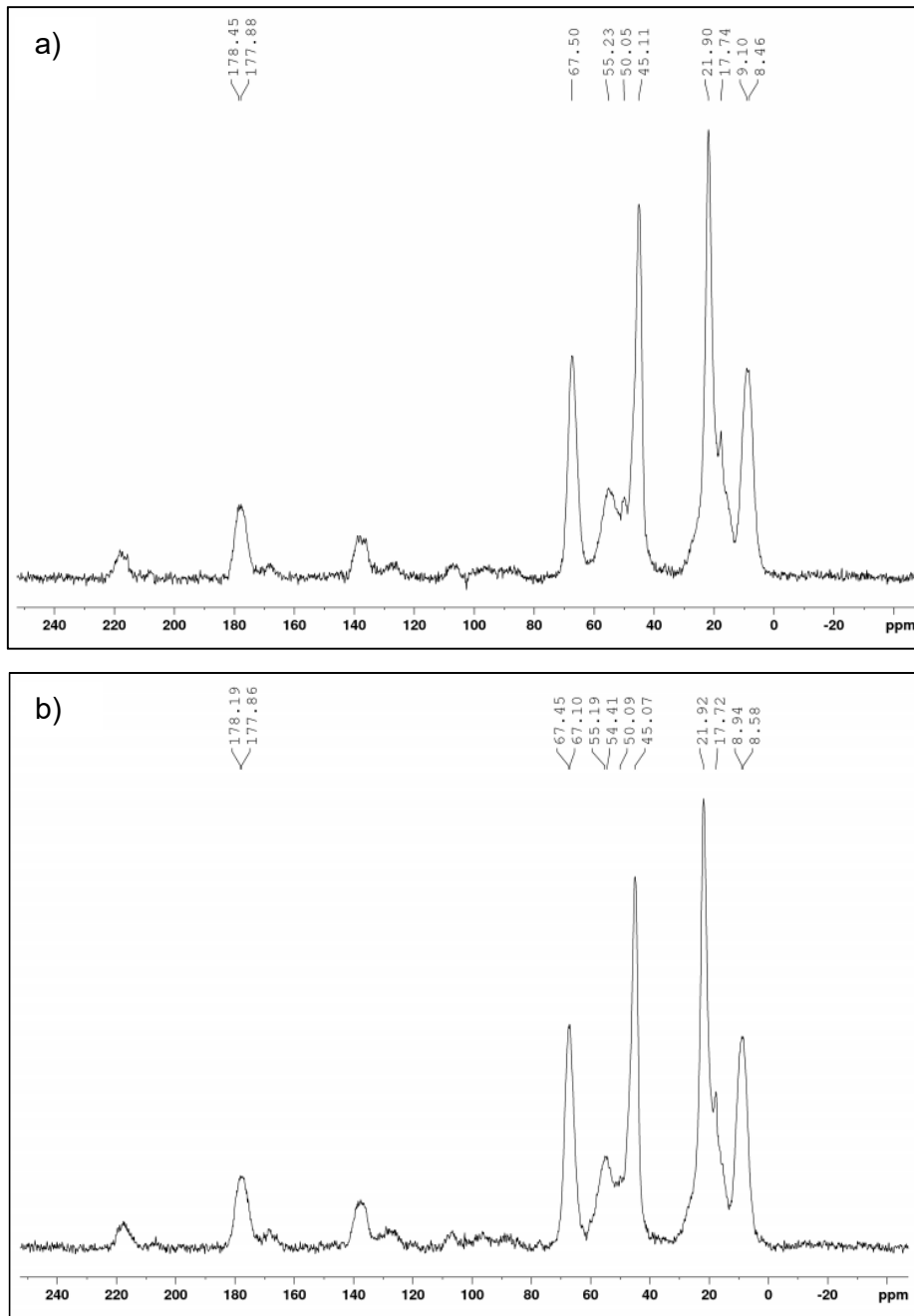
Tabela 10 – Deslocamentos químicos obtidos do espectro de NMR no estado sólido do  $^{13}\text{C}$  no polímero da coluna monolítica e suas respectivas atribuições

| <b>Deslocamento Químico<sup>a</sup> (<math>\delta</math>, ppm)</b> | <b>Atribuição<sup>a</sup></b> | <b>Deslocamento Químico<sup>b</sup> (<math>\delta</math>, ppm)</b> | <b>Atribuição<sup>b</sup></b> |
|--|-------------------------------|--|-------------------------------|
| 8,46   | C-7                           | 8,58   | C-7                           |
| 9,10   | C-7'                          | 8,94   | C-7'                          |
| 17,74  | C-1                           | 17,72  | C-1                           |
| 21,90  | C-1'                          | 21,92  | C-1'                          |
| 45,11  | C-2                           | 45,07  | C-2                           |
| 50,05  | C-6                           | 50,09  | C-6                           |
| 55,23  | C-5                           | 54,41  | C-5                           |
| 67,50  | C-3                           | 55,19  | C-5'                          |
| 177,78   | C-4'                          | 67,10  | C-3                           |
| 178,45   | C-4                           | 67,45  | C-3'                          |
| -  | -                             | 177,86   | C-4'                          |
| -  | -                             | 178,19   | C-4                           |

Obs.: a: polímero após limpeza com metanol; b: polímero sem limpeza com metanol

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Figura 37 – Espectros de NMR no estado sólido do  $^{13}\text{C}$  no polímero da coluna monolítica

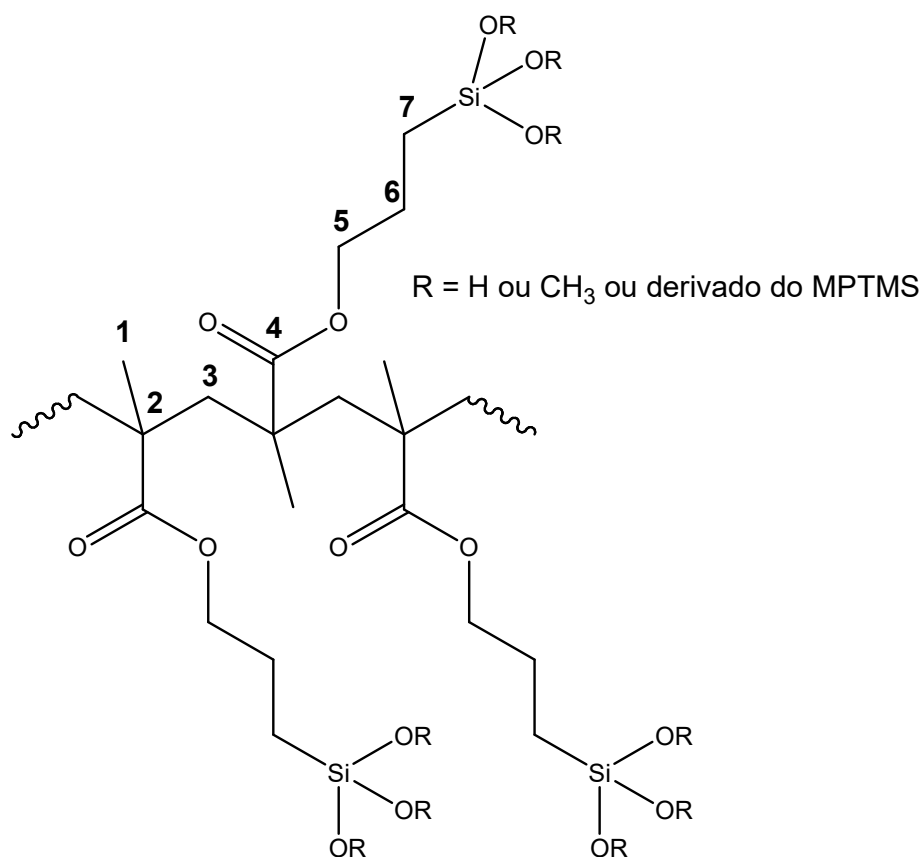


a) após limpeza com metanol e b) sem limpeza com metanol

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Uma possível estrutura mostrando o arranjo da cadeia carbônica para o polímero é apresentada na Figura 38 com os carbonos numerados conforme a tabela de atribuições.

Figura 38 – Possível arranjo da cadeia carbônica na estrutura do polímero da coluna monolítica baseada no MPTMS



**1** α-metil (-CH<sub>3</sub>); **2** quaternário (>C<); **3** metileno (-CH<sub>2</sub>-); **4** carbonila (>C=O); **5** éster metileno (-OCH<sub>2</sub>-); **6** metileno (-CH<sub>2</sub>-); **7** metileno (-CH<sub>2</sub>-Si)

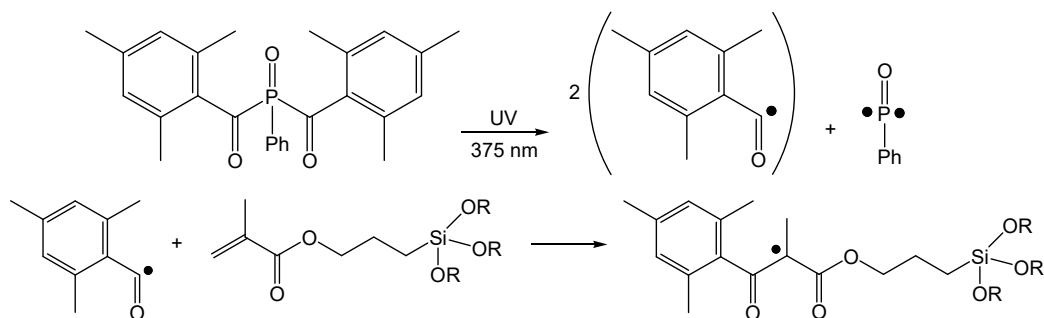
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A estrutura revela a presença de grupos α-metil (-CH<sub>3</sub>) e metileno (-CH<sub>2</sub>-; -CH<sub>2</sub>-Si) que podem ser os responsáveis por conferir a hidrofobicidade da fase estacionária monolítica produzida a partir do MPTMS.

Nos espectros da Figura 37, embora os deslocamentos químicos não estejam destacados, pode-se notar sinais com deslocamentos químicos em torno de 126, 127 e 135 ppm, região do espectro relacionada à presença de cadeias aromáticas (AGRAWAL, 1989). Esse resultado era esperado, uma vez

que o fotoiniciador da polimerização apresenta esse grupo em sua estrutura. No processo de adição radicalar ele pode ser incorporado a estrutura do polímero (Figura 39). Entretanto, a porcentagem de fotoiniciador em relação ao MPTMS na mistura polimérica é de apenas 3,5% e sua influência pode não ser relevante no processo de retenção de analitos pela coluna monolítica.

Figura 39 – Processo de adição radicalar do fotoiniciador ao monômero metacrilato



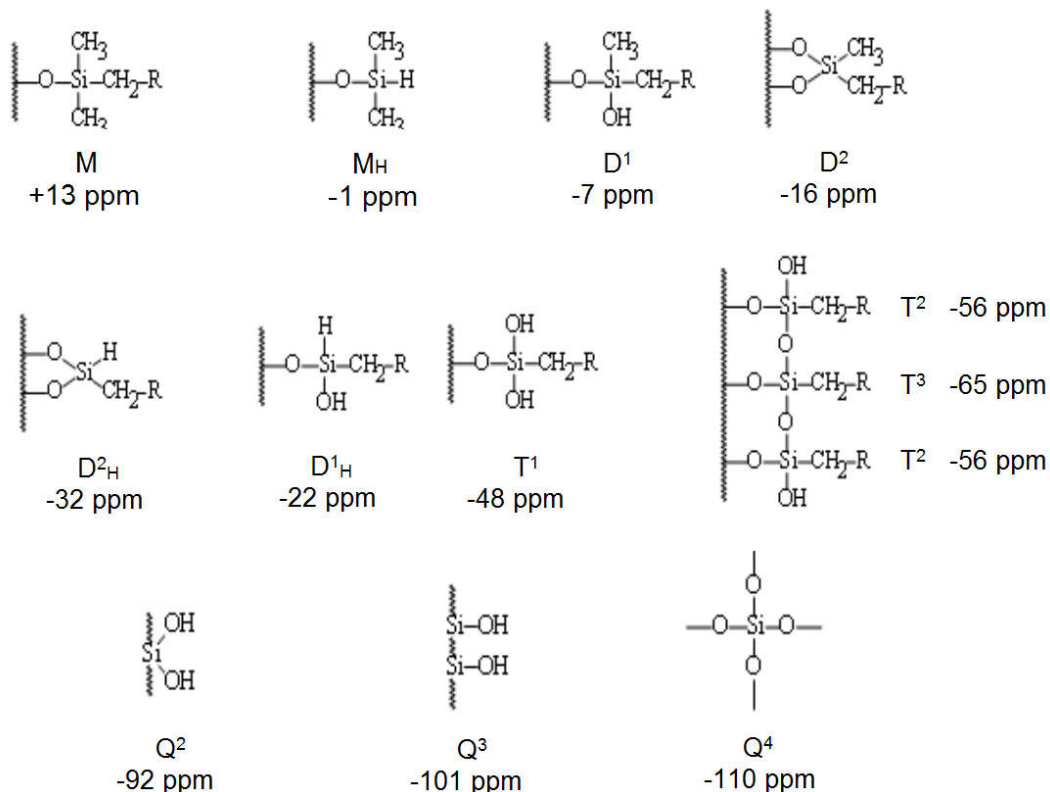
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

#### 4.7 ANÁLISE DE NMR NO ESTADO SÓLIDO DO $^{29}\text{Si}$ NO POLÍMERO DA COLUNA MONOLÍTICA

Os trialcoxissilanos, como o MPTMS, são moléculas em que três grupos alcoxi (radical derivado de álcool) se ligam a um átomo de silício. No preparo da solução fotopolimerizável existe uma etapa de hidrólise seguida de condensação de monômeros de MPTMS a partir dos grupos trialcoxissilil, havendo a possibilidade de formação de oligômeros com diferentes graus de condensação, como foi mencionado na seção 1.3.3. Essa condensação ocorre através de ligações siloxanas (Si-O-Si). Assim, é possível encontrar o grupo trialcoxissilil com diferentes graus de substituição química ao longo da estrutura do polímero.

A técnica de NMR no estado sólido do  $^{29}\text{Si}$  permite identificar essas substituições e suas abundâncias. Na Figura 40 estão representados os valores de deslocamentos químicos do núcleo de  $^{29}\text{Si}$ , símbolos e ordens das espécies de silil como são encontrados na literatura (WARAD et al., 2012).

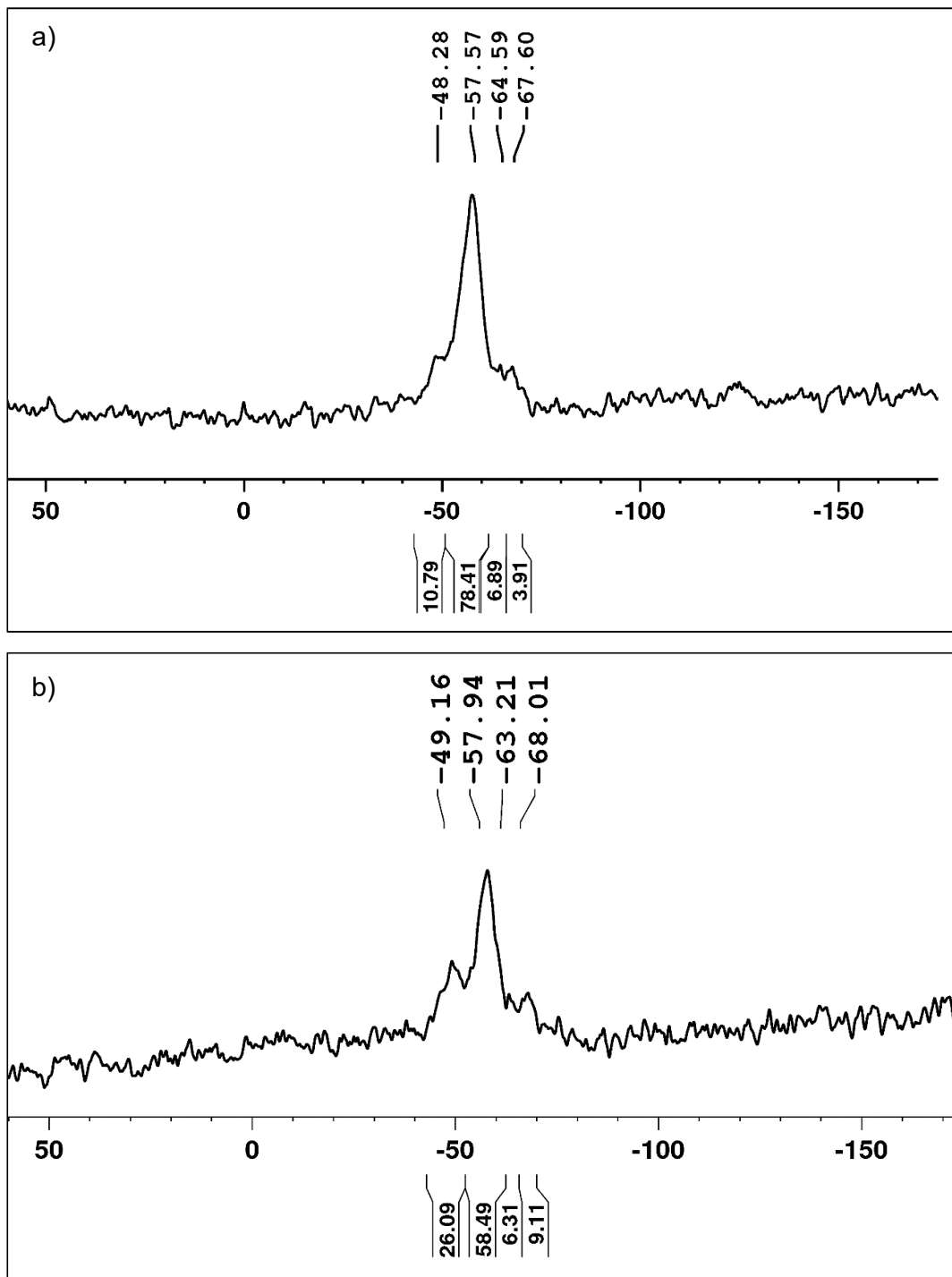
Figura 40 – Esquema mostrando a representação universal dos deslocamentos químicos de  $^{29}\text{Si}$ , símbolos e ordens das espécies de silil



Fonte: ADAPTADA DE WARAD et al., 2012

A Figura 41 apresenta o espectro de NMR no estado sólido do  $^{29}\text{Si}$  no polímero da coluna monolítica e as atribuições feitas aos deslocamentos químicos são apresentadas na Tabela 11 e foram adotados como referência o trabalho de WARAD et al., 2012 que trata da análise de NMR no estado sólido de polímeros de octadeciltrióxosilanos.

Figura 41 - Espectros de NMR no estado sólido do  $^{29}\text{Si}$  no polímero da coluna monolítica



a) espectro do polímero sem modificação; b) espectro do polímero modificado com benzil metacrilato

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Tabela 11 – Deslocamentos químicos obtidos do espectro de NMR no estado sólido do  $^{29}\text{Si}$  no polímero da coluna monolítica e suas respectivas atribuições

| <b>Deslocamento Químico (<math>\delta</math>, ppm)</b>     | <b>Atribuição</b> | <b>Abundância (%)</b> |
|--|-------------------|-----------------------|
| <b>Coluna monolítica sem modificação</b>                   |                   |                       |
| 48,28  | T <sup>1</sup>    | 10,79                 |
| 57,57  | T <sup>2</sup>    | 78,41                 |
| 64,59  | T <sup>3</sup>    | 6,89                  |
| 67,60  | T <sup>3'</sup>   | 3,91                  |
| <b>Coluna monolítica modificada com benzil metacrilato</b> |                   |                       |
| 49,16  | T <sup>1</sup>    | 26,09                 |
| 57,94  | T <sup>2</sup>    | 58,49                 |
| 63,21  | T <sup>3</sup>    | 6,31                  |
| 68,01  | T <sup>3'</sup>   | 9,11                  |

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

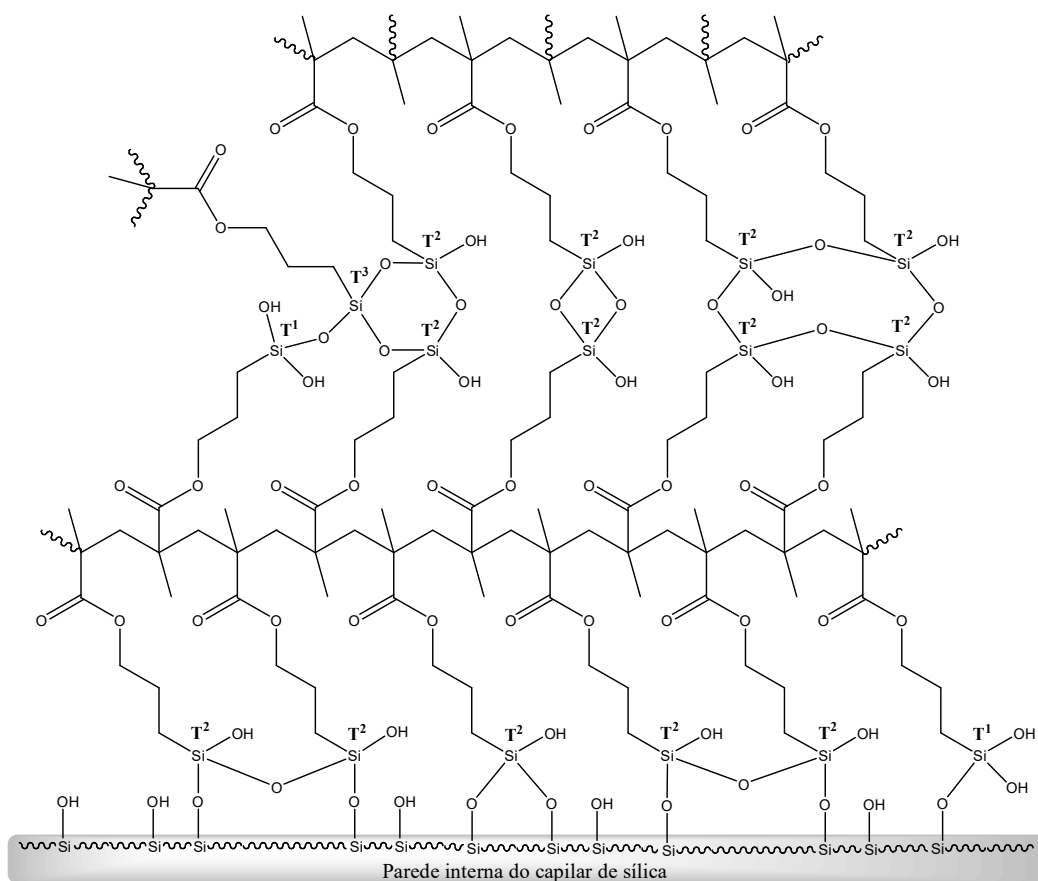
Pode-se notar que as espécies de ordem T<sup>2</sup> são as mais abundantes, apresentando o grupo trialcóxissilil duplamente substituído. Quando o polímero é modificado com o benzil metacrilato, a abundância das espécies de ordem T<sup>2</sup> diminui e há um aumento na abundância de T<sup>1</sup>. Uma explicação para isso é a redução da quantidade de MPTMS na mistura, alterando as condições da etapa de hidrólise e condensação dos monômeros de MPTMS. Em ambos os casos, a presença de T<sup>3</sup> é significativamente inferior às demais.

Uma estrutura do polímero mostrando a ancoragem na parede interna do capilar e a reticulação de cadeias carbônicas através de diferentes possibilidades de ligações siloxanas é proposta na Figura 42. Nota-se que a reticulação pode ocorrer por ligações siloxanas formadas entre espécies de trialcóxissilil de ordem T<sup>1</sup>, T<sup>2</sup> e T<sup>3</sup>, mas cabe ressaltar que, conforme a abundância

encontrada na Tabela 11, predominantemente a reticulação ocorrerá com a presença de espécies de ordem  $T^2$ .

Uma vez que variações no grau de substituição podem formar polímeros com diferentes quantidades de grupos silanóis, podem ocorrer variações drásticas no fluxo eletrosmótico nas análises por CEC. A capacidade de retenção de analitos pela coluna monolítica também pode ser alterada e interações indesejáveis entre analito e grupos silanóis podem ocorrer. Além disso, a própria estrutura tridimensional do polímero pode sofrer influência. Uma menor quantidade de espécies de ordem  $T^2$  pode dificultar a reticulação das cadeias poliméricas e causar a formação de regiões com baixa densidade de material.

Figura 42 – Estrutura polimérica com diferentes possibilidades de reticulação por ligações siloxanas entre unidades do MPTMS



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR



## 5 CONCLUSÕES

O desenvolvimento de colunas monolíticas tem ganhado grande atenção para aplicação em técnicas cromatográficas de dimensões capilares. O domínio do conhecimento na área de produção de colunas cromatográficas cria a liberdade para que se possa inovar e evitar as limitações das colunas comerciais. O levantamento bibliográfico realizado ao longo do trabalho permitiu a participação em um capítulo de livro sobre colunas monolíticas (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Além do mais, a produção de colunas monolíticas em capilares de sílica fundida permitiu o aproveitamento de um único equipamento para três técnicas: CE, CEC e CLC. Um equipamento de CE é de modo geral bastante compacto e o consumo de solventes é bastante reduzido, o que seria uma vantagem tanto do ponto de vista ambiental quanto do financeiro, quando se avalia o consumo e descarte de produtos químicos.

O aparato instrumental de um equipamento de CE se mostrou viável para os estudos envolvendo colunas monolíticas em CLC, uma vez que foi possível estabelecer uma relação linear entre a pressão aplicada para o bombeamento da fase móvel e a vazão da mesma. Vazões de fase móvel entre 0,83 a 2,26  $\mu\text{L min}^{-1}$  foram obtidas por CLC com aplicação de pressão. Esses valores foram superiores aos obtidos por CEC (0,40  $\mu\text{L min}^{-1}$ ) com vazão exclusivamente oriunda do fluxo eletrosmótico. Como perspectiva, as colunas monolíticas precisam ser testadas em um equipamento dedicado para CLC como forma de comparar os resultados e ampliar sua aplicação.

A utilização do C<sup>4</sup>D como *scanner* não invasivo para verificar a homogeneidade e densidade de material polimérico se mostrou promissora para o caso em que se deseja produzir novos sistemas de fases estacionárias monolíticas cuja densidade de material ou mesmo a porosidade precisam ser investigadas no processo de otimização da composição da solução polimerizável e outras condições de preparo.

Além disso, os dados de densidade de material obtidos a partir do C<sup>4</sup>D podem ser correlacionados, em trabalhos futuros, a performance de separação das colunas monolíticas no que diz respeito a sua capacidade de retenção de

analitos, por exemplo, colunas com alta densidade podem apresentar um tempo maior de retenção

O C<sup>4</sup>D também se mostrou importante para monitorar o preenchimento do capilar em capilares TSP para os casos envolvendo o preparo de colunas monolíticas por termopolimerização. Neste ponto, uma tentativa inicial de preparar uma coluna termopolimerizada em capilar TSP foi realizada com sucesso e a formação do polímero foi confirmada pela visualização microscópica do material polimérico no interior do capilar. Porém, essa coluna ainda precisa ser testada como coluna de separação em CEC e CLC. Além disso, todo o processo de preparo da coluna, incluindo composição da mistura de polimerização e condições de polimerização precisam ser investigadas e otimizadas.

Outro aspecto importante identificado neste trabalho com relação a verificação da densidade de material polimérico no interior do capilar foi a necessidade de centrifugação da solução polimerizável para eliminar eventuais resíduos de fase aquosa que possam alterar a porosidade do material. O preenchimento por capilaridade também foi um importante aspecto adotado neste trabalho para o aperfeiçoamento do preparo de colunas monolíticas como forma de melhorar a praticidade e evitar bolhas na introdução da solução polimerizável.

Neste trabalho foram otimizadas as condições das análises qualitativas por CLC envolvendo a separação simultânea de uma mistura de cinco HPAs (naftaleno, acenafteno, fluoreno, antraceno e fenantreno) e de uma mistura de três esteroides (estriol, 17- $\beta$ -estradiol e progesterona) utilizando a coluna monolítica capilar baseada no monômero MPTMS. No caso da separação de HPAs, a CEC apresentou maior eficiência de separação do que a CLC nas condições de análise estudadas.

Também foi demonstrada com essa coluna uma análise quantitativa por CEC envolvendo a separação simultânea de estriol e 17- $\beta$ -estradiol presentes em uma amostra de emulsão transdérmica que gerou um artigo publicado em revista indexada onde foi apresentado a quantificação dos esteroides por CEC (MARQUES *et al.*, 2015).

A coluna monolítica apresentou características apolares e o sistema cromatográfico como sendo de fase reversa. A caracterização química do

polímero foi feita pela espectroscopia de NMR no estado sólido do  $^{13}\text{C}$  e do  $^{29}\text{Si}$ . Foi possível propor uma estrutura para o arranjo da cadeia carbônica e o grau de substituição dos grupos alcoxisilil indicando reticulação das cadeias poliméricas de carbono através da formação de dímeros e trímeros do monômero.

A espectroscopia de NMR se mostrou uma ferramenta poderosa para estudar o grau de substituição dos grupos trialcoxisilil do MPTMS. Esse estudo é importante, uma vez que variações no grau de substituição podem formar polímeros com diferentes estruturas tanto do ponto de vista físico, com relação a densidade de material polimérico, quanto do ponto de vista químico, em que a presença de grupos silanóis podem influenciar o fluxo eletrosmótico e prover interações indesejáveis com os analitos.

## REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, P.; TOLLEY, H. D.; LEE, M. L. Characterizing Organic Monolithic Columns Using Capillary Flow Porometry and Scanning Electron Microscopy. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 247-254, 2012.
- AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. Amsterdam: Elsevier Science, 1989.
- ANDROVIČ, L.; BARTÁČEK, J.; SEDLÁK, M. Recent advances in the synthesis and applications of azo initiators. **Research on Chemical Intermediates**, v. 42, n. 6, p. 5133–5145, 2016.
- ARCAND-HOY, L. D.; NIMROD, A. C.; BENSON, W. H. Endocrine-Modulating Substances in the Environment: Estrogenic Effects of Pharmaceutical Products. **International Journal of Toxicology**, v. 17, n. 2, p. 139, 1 fev. 1998.
- ATKINS, P. W.; DE PAULA, J. **Físico-Química**. [s.l.] LTC Editora, 2009.
- BERNABÉ-ZAFÓN, V. et al. Comparison on photo-initiators for the preparation of methacrylate monolithic columns for capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3231–3237, 2010.
- BOCIAN, S.; SOUKUP, J.; MATYSKA, M. Influence of the organic modifier in hydro-organic mobile phase on separation selectivity of steroid hormones separation using cholesterol-bonded stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1245, p. 90, 6 jul. 2012.
- BRITO-NETO, J. G. A. et al. Understanding Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection in Capillary and Microchip Electrophoresis. Part 1. Fundamentals. **Electroanalysis**, v. 17, n. 13, p. 1198–1206, jul. 2005.
- BRITZ-MCKIBBIN, P. et al. Complementary on-line preconcentration strategies for steroids by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1013, n. 1–2, p. 65, 26 set. 2003.
- BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. [s.l.] McGraw Hill Brasil, 2012.

- CHERVET, J. P.; URSEM, M.; SALZMANN, J. P. Instrumental requirements for nanoscale liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 9, p. 1507–12, 1 maio 1996.
- CONNOLLY, D. et al. Evaluation of photografted charged sites within polymer monoliths in capillary columns using contactless conductivity detection. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 17, p. 3060–3068, 2007.
- CONNOLLY, D. et al. Non-invasive characterization of stationary phases in capillary flow systems using scanning capacitively coupled contactless conductivity detection (sC4D). **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 8, p. 870–884, set. 2010.
- COOMBS, M. M.; BHATT, T. S. **Cyclopenta(a)phenanthrenes: Polycyclic Aromatic Compounds Structurally Related to Steroids**. 1st. ed. Cambridge, UK: CUP Archive, 1987.
- DABEK-ZLOTORZYNSKA, E.; CELO, V.; YASSINE, M. M. Recent advances in CE and CEC of pollutants. **Electrophoresis**, p. 310–323, 2008.
- DE LA GUARDIA, M.; GARRIGUES, S. **Handbook of Green Analytical Chemistry**. 1. ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2012.
- DING, J. et al. Application of mixed mobile phases and a step gradient method in capillary electrochromatography for the separation of isomeric polycyclic aromatic hydrocarbon-deoxyribonucleoside adduct mixtures prepared in vitro. **Journal of Chromatography A**, v. 781, p. 327–334, 1997.
- FARIA, A. M. et al. Fases estacionarias monolíticas para separações cromatográficas. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 300, 2006.
- FLOR, S. et al. Simultaneous determination of nine endogenous steroids in human urine by polymeric-mixed micelle capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 31, n. 19, p. 3305, out. 2010.
- FRANCISCO, K. J. M.; DO LAGO, C. L. A compact and high-resolution version of a capacitively coupled contactless conductivity detector. **Electrophoresis**, v. 30, n. 19, p. 3458–3464, 2009.

- GARGUILO, M. et al. Laser-induced dispersed fluorescence detection of polycyclic aromatic compounds in soil extracts separated by capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 883, p. 231–248, 2000.
- GIACOMINI, D. R.; APARECIDA, E.; MELLA, C. Reposição Hormonal: vantagens e desvantagens. **Semina: Ciências Biológicas e Saúde**, v. 27, p. 71–92, 2006.
- GUSEV, I.; HUANG, X.; HORVATH, C. Capillary columns with in situ formed porous monolithic packing for micro high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 855, p. 273–290, 1999.
- HILDER, E.; SVEC, F.; FRÉCHET, J. Development and application of polymeric monolithic stationary phases for capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1044, p. 3–22, 2004.
- HUWITZ, A.; LIU, S. Determination of aqueous solubility and pKa values of estrogens. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 66, n. 5, p. 624, 1977.
- JIN, W. et al. Optimized preparation of poly(styrene-co- divinylbenzene-co- methacrylic acid) monolithic capillary column for capillary electrochromatography. **Electrophoresis**, v. 24, n. 18, p. 3172, set. 2003.
- LI, W.; FRIES, D.; MALIK, A. Sol-gel stationary phases for capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1044, p. 23–52, 2004.
- MALDANER, L.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1559–1568, 2010.
- MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214–222, 2009.
- MARQUES, R. et al. Optimized Separation Method for Estriol, 17- $\beta$ -Estradiol and Progesterone by Capillary Electrochromatography with Monolithic Column and its Application to a Transdermal Emulsion. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 2, 2015.

- NEPPEL, A.; BUTLER, I. S.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of poly(methyl methacrylate) and poly(ethyl methacrylate). **Journal of Molecular Structure**, v. 117, n. 1–2, p. 109–115, 1984.
- NOGA, M. et al. A practical guide to nano-LC troubleshooting. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 14, p. 2179–89, set. 2007.
- OLIVEIRA, M. A. L. DE et al. Preparação de Fases Estacionárias Monolíticas: Fundamentos, Conceitos e Aplicações. In: BEATRIZ, A.; ALVES, W. A. (Eds.). . **Série Química: Ciência e Tecnologia - Química Supramolecular e Nanotecnologia**. 1ª ed. São Paulo: [s.n.]. p. 535–546.
- OU, J.; GIBSON, G. T. ; OLESCHUCK, R. D. Fast preparation of photopolymerized poly (benzyl methacrylate- co-bisphenol A dimethacrylate) monoliths for capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 22, p. 3628–3634, 2010.
- PATERSON, C. J.; BOUGHTFLOWER, R. J. Capillary electrochromatography (CEC). In: **Handbook of Analytical Separations**. [s.l.] Elsevier Science B. V., 2000. v. 1p. 107–125.
- PIMENTEL, M. F.; NETO, B. DE B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 268–277, 1996.
- POLONINI, H. C. et al. Transdermal formulations containing human sexual steroids: development and validation of methods and in vitro drug release. **Química Nova**, v. 37, n. 4, p. 720–727, 2014.
- POLONINI, H. C.; RAPOSO, N. R. B.; BRANDÃO, M. A. F. Hormone replacement therapy and women's health during climacteric: risks and benefits. **Resvita de APS**, v. 14, n. 3, p. 354–361, 2011.
- POSTHUMUS, W.; MAGUSIN, P. Surface modification of oxidic nanoparticles using 3-methacryloxypropyltrimethoxysilane. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 269, p. 109–116, 2004.
- PRÖFROCK, D. Progress and possible applications of miniaturised separation techniques and elemental mass spectrometry for quantitative, heteroatom-tagged proteomics. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 398, n. 6, p. 2383–401, nov. 2010.

- PURSCH, M.; SANDER, L. C. Stationary phases for capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 887, p. 313–326, 28 jul. 2000.
- RIBEIRO, S. P. et al. Construção de um dispositivo de pressurização a vácuo para a preparação de fases estacionárias monolíticas via processo sol-gel. **Química Nova**, v. 38, n. 6, p. 868–873, 2015.
- ROUX, R. et al. Synthesis of propyl-functionalized hybrid monolithic silica capillaries and evaluation of their performances in nano-LC and CEC. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 17, p. 3035–42, nov. 2007.
- RUGGIERO, R. Estrogen: physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy. **Journal of Midwifery & Women's Health**, v. 47, n. 3, p. 130, jun. 2002.
- SATINDER, A.; MOHAMEDILIAS, J. **Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis**. 1. ed. [s.l.] Academic Press, 2008.
- SEGATO, M. P.; SILVA, C. R.; JARDIM, I. C. S. F. Eletrocromatografia capilar: contextualização, estado da arte e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 431, 2009.
- SILVA, R. G. D. C.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. G. Cromatografia Líquida Capilar: Estado da Arte e Aplicações. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 841–849, 2011.
- SILVA, J. A. F. DA; LAGO, C. L. DO. An oscillometric detector for capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 20, p. 4339–4343, 1998.
- SILVA, J. A. F. DA. Detecção eletroquímica em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 56-64.
- SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de química analítica**. 8ª ed. [s.l.] Thomson, 2005.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- SIOUFFI, A. -M. Silica gel-based monoliths prepared by the sol-gel method: facts and figures. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 801-818, 2003.



- SVEC, F. Porous polymer monoliths: Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 902, 2010.
- SVEC, F.; TENNIKOVA, T. B.; DEYL, Z. Monolithic Materials: Preparation, Properties and Applications. **Journal of Chromatography Library**, v. 67, p. 800, 2003.
- TAVARES, M. F. M. Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar. **Química Nova**, v. 97, n. 1, p. 493–511, 1997.
- TAVARES, M. I. B.; MONTEIRO, E. E. C. Solid State <sup>13</sup>C NMR Study of Methyl Methacrylate-Methacrylic Acid Copolymers. **Annals of Magnetic Resonance**, v. 4, n. 3, p. 69–72, 2005.
- USP – The United States Pharmacopeia**. 37. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention: [s.n.].
- VAZ, F. et al. Optimization of photo-polymerized sol–gel monolithic stationary phases prepared in polyacrylate-coated fused-silica capillaries for capillary electrochromatography. **Microchemical Journal**, v. 100, p. 21–26, jan. 2012.
- VAZ, F. A. S. et al. External polyacrylate-coating as alternative material for preparation of photopolymerized sol–gel monolithic column. **Talanta**, v. 76, p. 226, 2008a.
- VAZ, F. A. S. et al. Construção de Câmara de Luz Ultravioleta para Fotopolimerização de Fases Estacionárias Monolíticas. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2156, 2008b.
- VISSERS, J. Microcolumn liquid chromatography: instrumentation, detection and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 779, p. 1–28, 1997.
- VON MÜHLEN, C.; LANÇAS, F. M. Cromatografia unificada. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 747–753, 2004.
- WANG, X. et al. Sulfoalkylbetaine-based monolithic column with mixed-mode of hydrophilic interaction and strong anion-exchange stationary phase for capillary electrochromatography. **Electrophoresis**, v. 31, n. 17, p. 2997, set. 2010.

- WARAD, I. et al. Synthesis and characterization of hybrid materials consisting of n-octadecyltriethoxysilane by using n-hexadecylamine as surfactant and Q0 and T0 cross-linkers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 5, p. 6279–6291, 2012.
- WU, M. et al. Preparation and application of organic-silica hybrid monolithic capillary columns. **Electrophoresis**, v. 32, n. 1, p. 105–115, jan. 2011.
- ZEMANN, A. J. et al. Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. **Analytical chemistry**, v. 70, n. 3, p. 563–7, 1 fev. 1998.
- ZHENG, J. et al. Coupled to Atmospheric Pressure Photoionization Mass Photopolymerized Sol-Gel Monolithic Coupled to Atmospheric Pressure. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, p. 43–57, 2007.
- ZHONG, H.; EL RASSI, Z. Neutral polar methacrylate-based monoliths for normal phase nano-LC and CEC of polar species including N-glycans. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 1, p. 10–20, jan. 2009.
- ZOU, H. et al. Monolithic stationary phases for liquid chromatography and capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 954, p. 5, 2002.